

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und
Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät der Charité-
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Thema: Auto-Antikörper gegen das 20S Proteasom:
Affinitätsreinigung, Immunfluoreszenz und diagnostische
Evaluierung

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae
(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité-
Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Michael Brychcy
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. G.-R.-Burmester
2. Prof. Dr. med. W.-J.- Mayet
3. Prof. Dr. med. H.Schulze-Koops

Datum der Promotion: 22.6.2007

Diese Arbeit ist meinen Eltern, Helga und Günter Brychcy gewidmet.

Inhalt

1. Einleitung

- 1.1. Autoimmunität
- 1.2. Prävalenz von Anti-Proteasomenantikörpern bei Autoimmunerkrankungen
- 1.3. Das Proteasomensystem
 - 1.3.1. Aufbau und Funktion des 20S Proteasoms
 - 1.3.2. Subzelluläre Proteasomenverteilung

2. Problemstellungen

3. Materialien und Methoden

- 3.1. Klinische und serologische Charakterisierung der untersuchten Patienten
 - 3.1.1. IgG-Isolierung aus Patientenserum
 - 3.1.2. Affinitätsreinigung der humanen Anti-Proteasomenantikörper
- 3.2. Monoklonale und polyklonale Referenzantikörper gegen Proteasomen
- 3.3. Antikörper zur Gegenfärbung definierter Zellstrukturen
- 3.4. Nachweis von Anti-Proteasomenantikörpern
 - 3.4.1. ELISA zum Nachweis von Anti-Proteasomenantikörpern
 - 3.4.2. Immunoblot zum Nachweis von Anti-Proteasomenantikörpern
- 3.5. Verwendete Zellkulturen zur Immunfluoreszenz
- 3.6. Indirekte Immunfluoreszenz
- 3.7. Inhibitionstest der Antikörperbindung durch 20S-Proteasomen
- 3.8. Messung der Proteasomenaktivität

4. Ergebnisse

- 4.1. Klinische und serologische Charakterisierung der Patienten
- 4.2. Isolation und Quantifizierung der Anti-Proteasomenantikörper
- 4.3. Generierung und Spezifitätskontrolle der monoklonalen und polyklonalen Anti-Proteasomenantikörper
- 4.4. Untersuchungen in der direkten und indirekten Immunfluoreszenz (IIF)
 - 4.4.1. Charakterisierung der monoklonalen Antikörper in der Immunfluoreszenz
 - 4.4.2. Analyse des Immunfluoreszenzmusters von Anti-Proteasomenantikörpern
 - 4.4.3. Zuordnung der Proteasomenlokalisationen zu bestimmten Zellstrukturen
 - 4.4.4. Besonderheiten in den Färbungen
 - 4.4.5. Immunfluoreszenz affinitätsgereinigter Antikörper und ihrer Ausgangsseren im Vergleich
 - 4.4.6. Immunfluoreszenz von Anti-Proteasomenantikörpern auf anderen Zelllinien
 - 4.4.7. Ein möglicher Einfluss von Interferon- γ auf das Proteasomenmuster
- 4.5. Blockierung unspezifischer Bindungsstellen der Kulturzellen
- 4.6. Konkurrenz der Antikörperbindungsstellen durch 20S-Proteasomen
- 4.7. Antikörperklassen- und Subklassen-ELISA
- 4.8. Protease Assay

5. Diskussion

- 5.1. Humane Anti-Proteasomenantikörper wurden erstmals in Reinform dargestellt und charakterisiert
- 5.2. Anti-Proteasomenantikörper in der Immunfluoreszenz
 - 5.2.1. Humane Anti-Proteasomenantikörper zeigten typische Verteilungsmuster für Proteasomen
 - 5.2.2. Referenzantikörper mit individuellen Färbecharakteristika - Hinweis auf unterschiedliche Proteasomenentitäten?
- 5.3. In vitro wird die Proteasomenfunktion von Anti-Proteasomenantikörpern nicht beeinflusst
- 5.4. Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Anti-Proteasomenantikörpern ist besonders unter differentialdiagnostischen Gesichtspunkten wichtig.
- 5.5. Einfluss auf Anti-Proteasomenantikörper im Krankheitsverlauf

6. Zusammenfassung

Anhang 1: Abbildungen

Anhang 2: Formeln

Anhang 3: Glossar

Literatur

Danksagung

Eidesstattliche Erklärung

Lebenslauf

1. Einleitung

Das 20S-Proteasom wurde als humorales Autoantigen bei systemischen und organspezifischen Autoimmunerkrankungen sowie bei paraneoplastischen Syndromen identifiziert (Arribas et al. 1991, Feist et al. 1996, 1999, 2003, Mayo et al. 2002, Storstein et al. 2005). Dabei konnte insbesondere eine hohe Prävalenz von Anti-Proteasomenantikörpern bei Kollagenosen nachgewiesen werden. Aufgrund der zentralen Rolle des Proteasoms im Stoffwechsel von eukaryonten Zellen und bei der Regulation von Entzündungsprozessen ist dieses Autoimmunphänomen von hohem klinischen und wissenschaftlichen Interesse (Feist et al. 2000). Die pathogenetische Bedeutung bzw. die physiologische Funktion sowie die Herkunft, die immunologischen Eigenschaften und das diagnostische und prognostische Potential von Anti-Proteasomenantikörpern sind jedoch noch nicht ausreichend geklärt. In den bisherigen Untersuchungen konnte zunächst die Prävalenz und Spezifität von Anti-Proteasomenantikörpern mittels Enzymimmunoassay (ELISA), Immunelektrophorese und Immunoblotverfahren bei den jeweiligen Krankheitsbildern beschrieben werden. Eine Isolierung dieser Antikörper zur weiterführenden immunologischen Charakterisierung und zur eindeutigen Darstellung in der Immunfluoreszenz ist bisher nicht erfolgt. Diese Untersuchungen stellen jedoch einen Schlüssel zur Einschätzung der pathogenetischen und diagnostischen Bedeutung von Anti-Proteasomenantikörpern dar. Dabei gilt die indirekte Immunfluoreszenz (IIF) als ein wichtiges Standard- und Screeningverfahren zur Identifizierung von Auto-Antikörpern bei Autoimmunerkrankungen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgt erstmalig die Identifizierung und Charakterisierung dieser Auto-Antikörper durch Affinitätsreinigung an 20S-Proteasomen und die Darstellung der Fluoreszenzmuster gereinigter humaner antiproteasomaler Auto-Antikörper durch die indirekte Immunfluoreszenz. Durch den direkten Vergleich der Fluoreszenzmuster der gereinigten Antikörper mit den Mustern der jeweiligen Ausgangsseren konnte die Tauglichkeit dieses Verfahrens zum Nachweis der Antikörper gezeigt werden.

Aus den gewonnenen Untersuchungsergebnissen waren Rückschlüsse auf die Quantität von Anti-Proteasomenantikörpern in den Patientenseren möglich. In *in vitro*-Untersuchungen wurde der direkte Einfluss dieser Antikörper auf die proteolytische Funktion von 20S Proteasomen überprüft. Die Ergebnisse dienen zur weiteren Aufklärung der pathogenetischen Bedeutung des Proteasomensystems und ihrer korrespondierenden Auto-Antikörper bei systemischen Autoimmunerkrankungen.

1.1. Autoimmunität

Als Autoimmunerkrankungen werden Krankheitsbilder aufgefasst, bei denen sich infolge einer komplexen Störung des Immunsystems humorale (Antikörper und Komplementsystem) und/oder zelluläre Immunreaktionen (durch T-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen) spezifisch gegen körpereigene Antigene richten. Diese Auto-Antigene sind in der Regel im Laufe der Evolution hochkonservierte Proteine oder Protein/RNA-Komplexe, die im Stoffwechsel der Zellen oft zentrale Funktionen ausüben (Tan und Chan, 1993).

Die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen konnte bisher nicht eindeutig aufgeklärt werden. Es verdichten sich jedoch Hinweise, dass es sich um multifaktorielle und keinesfalls einheitliche Ursachen handelt. In einem sehr komplexen Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen können die Regulationsmechanismen der Immunreaktionen gestört werden. Es gibt zahlreiche Tiermodelle für unterschiedliche Autoimmunerkrankungen. Aus diesen Untersuchungen wurden verschiedene Theorien über ihre Ursachen abgeleitet.

Für die Entstehung von Auto-Antikörpern spielen B-Zell-Aberrationen eine besondere Rolle. Kreuzreaktionen von endogenen Autoantigenen mit bakteriellen oder viralen Proteinen sowie molekulare Mimikry sind möglicherweise für die Entstehung autoreaktiver B-Zellen verantwortlich. Posttranslationale Modifizierungen der Antigene führen zur Entstehung von Neoepitopen und lösen dabei wahrscheinlich die Erkennung durch B-Zellen aus. In der weiteren Entwicklung der B-Zellen führen somatische Mutationen, Isotype switching und/oder V(D)J-Rearrangements zur

Bildung von B-Zellklonen und zu hochaffinen Auto-Antikörpern. Ist das Immunsystem nicht in der Lage, autoreaktive B-Zellklone zu unterdrücken, kommt es zu einer Autoimmunreaktion (Ohmori et al. 2003). Die Mechanismen der Unterdrückung autoreaktiver B-Zellklone stehen derzeit im Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen (Viau et al. 2005, Noelle et al. 2005).

Proteasomen spielen bei der T-Zell vermittelten Autoimmunität eine zentrale Rolle. Dabei wurden gewebespezifische Antigenprozessierungen durch Proteasomen nachgewiesen, die bestimmte Organmanifestationen bei Autoimmunerkrankungen erklären könnten (Kuckelkorn et al. 2002).

Auto-Antikörper gegen Strukturen des Zellkerns sind anerkannte diagnostische Marker für Autoimmunerkrankungen, da sie krankheitsspezifische nukleäre Auto-Antigene erkennen (Colglazier et al. 2005, Barnett et al. 1966, Tan et al. 1997, Fernandez et al. 1976). Diese Antikörper werden auch Antinukleäre Antikörper (ANA) genannt. Die Entstehung dieser Antikörper ist vermutlich ebenfalls mit der Funktion des Proteasomensystems assoziiert (Chen et al. 2005). In bestimmten Fällen haben auch zytoplasmatische Antigene wie Ribosomen, Mitochondrien und zytoskelettassoziierte Proteine eine diagnostische und prognostische Relevanz (Mathy et al. 1980, Rekvig et al. 1979).

Es wurde auch gezeigt, dass antinukleäre Antikörper in der Lage sind, Zellmembranen zu überwinden. Dieser Prozess findet sowohl durch Bindung an Fc-Rezeptoren als auch rezeptorunabhängig statt (Alarcon-Segovia et al. 1978, Golan 1997, Hormigo et al. 1996). Somit können Auto-Antikörper neben der Auslösung systemischer inflammatorischer Reaktionen durch Bildung zirkulierender Immunkomplexe den Organismus auch auf subzellulärer Ebene stören (Deng et al. 2000, Koscec et al. 1997).

Antikörperprofile können also offensichtlich neben ihrer Bedeutung als diagnostischer Parameter auch an der Pathogenese und der Ausprägung der Symptomatik von Autoimmunerkrankungen beteiligt sein. Für Anti-

Proteasomenantikörper ist ein solcher Zusammenhang bisher noch nicht nachgewiesen worden.

1.2. Prävalenz von Anti-Proteasomenantikörpern bei Autoimmunerkrankungen

Einige Auto-Antikörper besitzen als diagnostische Marker eine große Bedeutung, da ihr Auftreten eng mit bestimmten Autoimmunerkrankungen bzw. deren Krankheitsverläufen und -aktivität korreliert (Tab.1). Häufig können sie entscheidend zur Frühdiagnose von Autoimmunerkrankungen beitragen und sind in einigen Fällen bereits Jahre vor der Erstmanifestation der Erkrankung nachweisbar (Arbuckle et al. 2003).

Anti-Proteasomenantikörper konnten bisher in signifikant erhöhter Prävalenz bei Kollagenosen, insbesondere bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE), Poly-/Dermatomyositis (PM/DM) und primärem Sjögren Syndrom (pSS) nachgewiesen werden (Arribas et al. 1991, Feist et al. 1996, 1999). Darüber hinaus gelang ebenfalls ein Nachweis dieser Antikörper bei organspezifischen Autoimmunerkrankungen, beispielsweise bei der Enzephalomyelitis disseminata (Mayo et al. 2002) und beim Diabetes mellitus Typ I (Kordonouri et al. 2004).

Beim SLE stehen klinisch entzündliche Organbeteiligungen wie Glomerulonephritiden, Serositis, Pneumonitis, Karditis, Vaskulitis, Arthritis, Dermatitis und die Beteiligung des zentralen Nervensystems im Vordergrund. Serologisch ist diese Erkrankung insbesondere durch den Nachweis von antinukleären Auto-Antikörpern charakterisiert, wobei die Patienten ein variables Auto-Antikörperprofil aufweisen können. Von besonderer Bedeutung ist der Nachweis von Antikörpern gegen Doppelstrang-DNA (ds-DNA), der als hochspezifischer Marker der Erkrankung gilt und eng mit der Krankheitsaktivität sowie einer Nierenbeteiligung assoziiert ist (Putterman, 2004; Casals et al. 1964). Anti-Proteasomenantikörpern wurden zunächst beim SLE in einer Prävalenz von 35 % beschrieben (Arribas et al. 1991). Die Untersuchung einer eigenen Patientenkohorte erbrachte ebenfalls den Nachweis einer signifikant erhöhten Prävalenz dieser Antikörper, wobei 58% der Patienten mit SLE eine Antikörperreaktion gegen Proteasomen in ELISA und Immunoblot zeigten.

Als ein prädominantes Antigen wurde die Proteasomenuntereinheit HC9 (α 3) beschrieben (Feist et al. 1996).

Im Gegensatz zum SLE, bei dem serologische Marker mit hoher Spezifität und Sensitivität bekannt sind, sind Auto-Antikörper bei autoimmunen Myositiden nur bei etwa 20% der Fälle nachweisbar. Autoimmune Myositiden werden als Kollagenosen in Polymyositis (PM) und in Dermatomyositis (DM) unterteilt. Das Anti-Synthetase Syndrom als eigenständiges Krankheitsbild ist durch den Nachweis von Auto-Antikörpern gegen tRNA-Synthetasen bei assoziierter Arthritis, Raynaud-Phänomen und interstitieller Lungenfibrose gekennzeichnet. Klinisch liegt bei den autoimmunen Myositiden zumeist eine proximal betonte, symmetrische Muskelschwäche mit progredientem Verlust an Muskelmasse und häufig muskelkaterartigen Schmerzen vor. Bei der DM tritt zudem typischerweise ein hellviolettes Erythem mit bevorzugter Lokalisation im Gesicht (Augenoberlid, Nasenrücken, und Wangen) sowie im Dekolletébereich auf.

Myositisspezifische Anti-tRNA Synthetase Antikörper sind bei etwa 5 bis 20% der Myositisfälle nachweisbar, wobei in der indirekten Immunfluoreszenz ein zytoplasmatisches Muster vorliegt (Wolfe et al. 1977, Bernstein et al. 1993). Am häufigsten sind diese Auto-Antikörper gegen die Histidyl-tRNA Synthetase (Anti-Jo1-Antikörper) gerichtet (Levine et al. 2003, Matthews und Bernstein 1983). In vitro sind Anti-Synthetase Antikörper in der Lage, die Aktivität ihrer spezifischen tRNA-Synthetase zu beeinflussen und somit die Proteinsynthese zu hemmen (Plotz et al. 1994). Zu den myositisassoziierten Auto-Antikörper zählen weiterhin Anti-SRP (signal recognition particle)-, Anti-Mi2-, Anti-PM/Scl (Exosomen)- und Anti-U1RNP (Spliceosomen) Antikörper, die jedoch nur bei weniger als 10% der Patienten auftreten. Somit ergibt sich insbesondere bei den autoimmunen Myositiden ein dringender Bedarf an serologischen Markern. In diesem Zusammenhang waren initiale Ergebnisse zum Nachweis von Anti-Proteasomenantikörpern bei 62% der Patienten mit PM/DM von besonderer Bedeutung (Feist et al. 1996). Als das prädominante Antigen innerhalb des Proteasomenkomplexes wurde ebenfalls die Proteasomenuntereinheit HC9 (α 3) beschrieben

In weiterführenden Untersuchungen wurden Anti-Proteasomenantikörper ebenfalls bei Patienten mit primärem Sjögren Syndrom in 36% der Fälle nachgewiesen. Im Unterschied zu den anderen Krankheitsbildern fand sich jedoch eine ausgedehnte Antikörperreaktivität gegen verschiedene Proteasomenuntereinheiten im Sinne einer polyklonalen Reaktion. Das primäre Sjögren-Syndrom (pSS) ist ebenfalls eine chronisch-progressive Autoimmunerkrankung aus der Gruppe der Kollagenosen, wobei entzündliche Veränderungen vor allem die exokrinen Drüsen betreffen. Zu den wesentlichen Leitsymptomen des Krankheitsbildes gehören eine Keratokonjunktivitis sicca, und eine Trockenheit der Schleimhäute (insbesondere Xerostomie als Folge einer Sialadenitis und Parotitis). Extraglanduläre Manifestationen der Erkrankung können bei ca. 10-15% der Patienten in Form einer Arthritis, Vaskulitis, Lungen-, Nieren oder ZNS-Beteiligung auftreten. Der charakteristische Auto-Antikörperbefund beim pSS ist die Koinzidenz von Anti-Ro/SS-A (52 und 60 kDa) sowie Anti-La/SS-B (RNA Polymerase III) Antikörpern. Als Besonderheit besteht bei diesem Antikörperprofil in der Schwangerschaft ein erhöhtes Risiko für die Manifestation eines kongenitalen Herzblockes (Buyon et al. 1989; Dörner et al. 1995). Weitere typische serologische Veränderungen beim pSS sind eine Hypergammaglobulinämie durch Erhöhung der IgG-Fraktion sowie das Vorhandensein von Rheumafaktoren als Ausdruck der gestörten B-Zellfunktion.

Bei Fibromyalgiepatienten sind bisher weder spezifische Antikörperveränderungen noch inflammatorische Prozesse bekannt. In eigenen Untersuchungen konnten jedoch Anti-Proteasomenantikörper kasuistisch nachgewiesen werden. Dem aktuellen Krankheitsverständnis zufolge wird die Erkrankung als Störung der zentralen Schmerzverarbeitung angesehen. Die charakteristische Symptomatik ist ein Zusammenspiel von definierten Schmerzsymptomen sowie das Vorhandensein charakteristischer Triggerpunkte, an denen Schmerzreaktionen provoziert werden können. Es wird vermutet, dass niedrige Serotoninkonzentrationen in Thrombozyten, Serum und ZNS sowie erhöhte Spiegel von Substanz P im Liquor ursächlich beteiligt sind (Russell IJ 1994 [1], Crofford 1994, Russell IJ et al, 1994[2]). Aberrationen bei der Regulation der hypothalamisch-pituitarisch-adrenalen Hormone, insbesondere bei Wachstumshormon (GH) und Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I), wurden ebenfalls beschrieben (Adler et al. 2005, Griep et al. 1993). Keiner dieser Befunde ist jedoch als diagnostischer Marker verwendbar. Daher sind Untersuchungen von Anti-Proteasomenantikörpern in diesem Zusammenhang ebenfalls interessant.

Für die Multiple Sklerose wurden Anti-Proteasomenantikörper in einer Prävalenz von 66% im Serum und 61% im Liquor erkrankter Patienten beschrieben (Mayo et al 2002). Der Multiplen Sklerose liegt bei genetisch prädisponierten Individuen wahrscheinlich ein durch externe Faktoren getriggertes Autoimmungeschehen zugrunde, bei dem es zu T-Lymphozyten vermittelten Demyelinisierungen kommt (Noseworthy 1999, Noseworthy et al. 2000). Als humorale Immunantwort sind Antikörper gegen eine Reihe von myelinspezifischen Bestandteilen wie Myelin Basic Protein (MBP), α -Crystallin und Transaldolase (Colombo et al. 1997, van Noort et al. 1998, Esposito et al. 1999), 2'3' Cyclic Nucleotide 3'-phosphodiesterase (Walsh and Murray, 1998) und axonale Antigene in „axolemma-enriched fractions“ (DeVries 2004) bekannt. Die Rolle dieser Antikörper im Krankheitsgeschehen ist jedoch noch nicht geklärt.

Die vorliegende Arbeit hatte die Zielsetzung, schwerpunktmäßig Seren von Patienten mit Kollagenosen (SLE, DM, pSS und undifferenzierter Kollagenose) bezüglich einer näheren Charakterisierung von Anti-Proteasomenantikörpern zu untersuchen. Darüber hinaus wurde ein Anti-Proteasomenantikörper positiver Patient mit Fibromyalgie und eine gesunde Kontrolle zum Vergleich einbezogen. Mit Ausnahme der Fibromyalgie sind alle Erkrankungen der untersuchten Patienten mit anderen Auto-Antikörpern assoziiert (Tab. 1)

Tabelle 1: Assoziation ausgewählter antinukleärer Antikörper mit Autoimmunerkrankungen (Alexander et al. 1982; Levo et al. 1982, Sharp GC. 1982 Tan 1982 (1 und 2) Casalo et al. 1964, Feist et al 1996 und 1999; Bernstein et al. 1993)

Erkrankung	Charakteristische Antikörper (Prävalenz)	
	Auto-Antikörper	Anti-Proteasomen-antikörper
SLE	ds-DNA, Sm-D (30%), RNP (>20%), Ro (>30%), Nukleosomen	58%
pSS	Ro (>70%), La (>50%)	36%
PM/ DM	Jo1 (25-35%), PM/Scl, Mi-2, SRP	62%
MCTD	U1-RNP (>95%),	25%
Sclerodermie	Scl70 (>50%)	nicht bekannt
CREST-Syndrom	Centromeren	nicht bekannt
Fibromyalgie	Keine	nicht bekannt

1.3. Das Proteasomensystem

1.3.1. Aufbau und Funktion des 20S Proteasoms

Das 20S Proteasom ist ein hochkonservierter, intrazellulärer Proteasekomplex, der ubiquitär im Zytoplasma von eukaryontischen Zellen vorkommt (Rechsteiner et al. 1993; Coux et al. 1996; Rivett et al. 1997). Das Proteasom gehört zu einer Proteasefamilie, für deren multikatalytische Eigenschaften neben einer Konservierung von gewissen Aminosäurepositionen ein N-terminales nucleophiles Threonin essentiell ist (Seemüller et al. 1995; Groll et al. 1997). Die Interaktion mit Regulatorkomplexen des Proteasoms führt zur Bildung einer 26S-Protease, die eine Hauptrolle im nichtlysosomalen ubiquitinabhängigen Proteinabbau einnimmt (Seufert et al. 1992, Sawada et al. 1993). Das Proteasom ist die wichtigste Protease in der Prozessierung antigener Peptide. Diese können durch weitere Peptidasen „bearbeitet“ und via MHC Klasse-I präsentiert werden. Gegebenenfalls können diese Peptide zur T-Lymphozytenaktivierung führen (Kloetzel et al. 2004). Über eine Beeinflussung durch Lipopolysaccharide ist die Proteasomenfunktion auch mit der Aktivierung des Makrophagensystems verbunden (Qureshi et al. 2005). Der Abbau bzw. die Aktivierung von wichtigen regulatorischen Proteinen der Zellen (z.B. Cyclin, NF κ B) stellt ebenfalls eine wichtige Funktion von Proteasomen dar (Groettrup et al. 1996, Rivett et al. 1997, Rammensee et al. 1993). Proteasomen selbst werden wahrscheinlich hauptsächlich durch Autophagozytose und in Lysosomen abgebaut (Cuervo et al. 1995).

Das 20S Proteasom besteht aus vier übereinandergelagerten Ringen von jeweils sieben verschiedenen Untereinheiten, die eine zylinderförmige Struktur bilden (Groll et al. 1997; Kopp et al. 1997, Abb. 1). Die Untereinheiten der äußeren Ringe gehören einer gemeinsamen Familie an (α 1-7) und sind insbesondere für die Interaktion mit anderen Proteinen wie z.B. dem 19S Regulatorkomplex verantwortlich (Ahn et al. 1995). Von den sieben Untereinheiten der inneren Ringe (β 1-7) sind drei durch IFN- γ induzierbare katalytische Untereinheiten austauschbar (β 1i, β 2i und β 5i), was zu einem verändertem Schnittverhalten und einer effizienteren Generierung von MHC Klasse I Antigenen führen kann. Die Proteasomen mit den genannten induzierten

Untereinheiten werden Immunoproteasomen genannt. Sie finden sich bei inflammatorischen Prozessen (Aki et al. 1994; Boes et al. 1994; Kuckelkorn et al. 1995; Nandi et al. 1996; Stohwasser et al. 1997).

Für die Untereinheiten α_2 , α_3 , α_4 und α_6 (HC3, HC9, HC6 und HC2) wurden eine Reihe von Interaktionen mit nicht-proteasomalen Proteinen bzw. Proteinkomplexen beschrieben, die z.T. regulatorische oder noch unbekannte Funktionen haben. Die Untereinheit α_3 (HC9) bindet offenbar das HTLV-1 TAX Protein (Rousset et al. 1996). Die Untereinheit α_6 (HC2) interagiert mit PA28, einem Regulator der Proteasomaktivität, der ebenfalls IFN- γ induzierbar ist und eine effizientere Generierung antigener Peptide fördert (Groettrup et al. 1996). Die Untereinheiten vom α -Typ 1-4 (lota, HC3, HC9 und HC6) tragen die für den intranukleären Transport des Proteasoms notwendigen Sequenzen (NLS) (Nederlof et al. 1995).

Das 26S Proteasom hat auf das NF κ B-System sowohl über die proteolytische Generierung der p50/p65 Untereinheiten des NF κ B als auch durch den Abbau des NF κ B-Inhibitors I κ B einen Einfluss. Die Proteasomenuntereinheit α_3 (HC9) soll dabei eine schwache Bindungsaffinität für p105 aufweisen (Rousset et al. 1996).

Das NF κ B-System spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung der Einleitung der Apoptose. Der Verlust der Fähigkeit der Zellen zur Apoptose ist eng mit der Tumorigenese und einigen Autoimmunerkrankungen wie dem SLE assoziiert. In B-Zellen beeinflussen Proteasomen durch Modifikationen des NF κ B-Systems wahrscheinlich auch die Antikörpersubklassenverteilung (Snapper et al. 1996).

Bei einer Reihe von pathologischen Zuständen wurde eine Erhöhung der mRNA für Ubiquitin und von ubiquitinkonjugierenden Enzymen (E2) beschrieben. Dies gilt auch für ausgewählte Proteasomen-Untereinheiten. So geht eine metabolische Azidose mit einer Erhöhung der mRNA von Untereinheit α_7 (HC8) und Sepsis mit erhöhter mRNA für α_2 (HC3) einher. Glucocorticoide erhöhen den Spiegel von α_6 (HC2) und YAH-Tumore eine nicht weiter charakterisierte 27 kDa Untereinheit des Proteasoms (Baracos et al. 1995, Isozaki et al. 1996; Tiao et al. 1997). Interessanterweise zeigten diese Untersuchungen ausschließlich einen Effekt in Bezug auf α -Untereinheiten, die die prädominanten Autoantigene innerhalb des Proteasomkomplexes darstellen.

Eine pharmakologische Blockade der Proteasomen bewirkt eine Anreicherung ubiquitinylierter Proteine und führt zu einer reduzierten Peptidpräsentation über den MHC-I Komplex (Rock et al., 1994). In Zellkulturen führte die Blockade zu zytostatischen Effekten und Apoptose, u.a. durch die Herunterregulierung des NF κ B Systems. Dabei reagieren proliferierende Zellen besonders empfindlich auf Proteasomeninhibitoren. Dieser Effekt zeigte sich auch bei Tumorzellen, die gegen konventionelle Zytostatika weitgehend resistent waren (Banerjee et al. 2001). Es wird jedoch auch in gesunden Zellen Apoptose induziert (Porcile et al., 2002). In Arthritismodellen konnten Proteasomeninhibitoren durch die Hemmung der Proteasomenfunktion über die Aktivierung der Caspase-Kaskade Apoptose von Synoviazellen auslösen (Kawakami et al. 1999). Neben der Induktion von Apoptose führt auch eine Hemmung der Angiogenese durch Inhibition von Proteasomen zur Reduktion von Tumorzellen bzw. Synoviazellen bei Arthritis (Ondrey et al. 1999). Wie bereits im Model der Streptokokken-A Zellwand induzierten Polyarthritits gezeigt werden konnte, führt eine Inhibition der Proteasomenaktivität zu einem anti-inflammatorischen Effekt (Palombella et al. 1998). Vielversprechende Ansätze zeigt die pharmakologische Beeinflussung der Proteasomenfunktion auch bei der Immunsuppression für die Transplantationsmedizin und zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen (Wu et al. 2002).

Weiterhin führt eine reduzierte proteasomale Funktion zu einer verstärkten Ablagerung von Lipofuszin, einer Erscheinung die im Zusammenhang von Zellalterungsprozessen beobachtet wird (Terman et al. 2002). Neben der Beeinflussung von Autoimmunerkrankungen und Malignomen gibt es Hinweise, dass die Pathogenese von allergischem Asthma, der Multiplen Sklerose, der Alzheimer Erkrankung und der Reperfusionserkrankung eng mit der Proteasomenfunktion verbunden ist (Elliott et al. 2003). Die Einflüsse der Proteasomenfunktion auf die Immunmodulation unter *in vivo*-Bedingungen bleibt jedoch weiterhin ungeklärt.

Bei Patienten mit SLE, Sjögren Syndrom, autoimmuner Myositis, rheumatoider Arthritis, autoimmuner Hepatitis und Myasthenia gravis wurden zirkulierende Proteasomen im Plasma nachgewiesen, deren Titer mit dem klinischen Verlauf, und den Verlaufsmarkern CRP, sVCAM, sICAM und sELAM korrelierten (Egerer et al. 2002, Dutaud et al. 2002). In Sepsis- und Traumapatienten wurden ebenfalls erhöhte Titer zirkulierender Proteasomen nachgewiesen. Der Titer zirkulierender

Proteasomen wird dabei als Marker für die Erkrankungsaktivität und den Zellschaden diskutiert sowie für Muskelschäden bei schwerstkranken Patienten angesehen (Roth et al. 2005). Erhöhte Spiegel zirkulierender Proteasomen in metastasierten Melanomen mit hoher Tumorlast weisen ebenfalls auf eine Korrelation mit dem krankheitsassoziierten Zellumsatz sowie einer unspezifischen inflammatorischen Reaktion hin (Stoebner et al. 2005).

Da α -Untereinheiten, die die beiden äußeren Ringe des Proteasomkomplexes bilden, die prädominanten Zielantigene darstellen, wären sie einer Antikörperbindung zugänglich bzw. könnten durch die Antikörper in ihrer Funktion beeinflusst werden.

1.3.2. Subzelluläre Proteasomenverteilung

Die intrazelluläre Verteilung der Proteasomen ist abhängig von einer Vielzahl von Faktoren, wie Zellart, dem untersuchten Proteasomenbestandteil, der benutzten Antikörper, der Methodik der Zellkultur, dem Einfluss von Zytokinen sowie der Bearbeitung der Zellen für die Färbeprozedur.

Zellen höherer Lebewesen zeigen eine komplexe, dynamische Verteilung. In HT1080 Fibrosarkomzellen wurde ein unidirektionaler Transport von Proteasomen vom Zytoplasma in den Nukleus nachgewiesen. Die Nucleoli blieben ausgespart. Die Desintegration der Kernhülle (Nuclear Envelope) während der Mitose führt zu einer raschen Rückverteilung in das Zytoplasma. Dabei befindet sich der größte Teil der Proteasomen in mobiler, nicht strukturgebundener Form. Lediglich 2-8% der Proteasomen sind an Zellstrukturen gebunden. Während des Fixierungsprozesses kondensierten Proteasomen jedoch an Bestandteilen des Zytoskelettes und lieferten ein strukturelles Muster (Reits et al. 1997). In Zellen der Hefe *Schizosaccaromyces pombe* wurde gezeigt, dass sich die Proteasomenpopulationen im Zustand der Interphase und der Mitose hauptsächlich innerhalb des Nuclear Envelope befinden. Zellen in der zweiten meiotischen Teilung zeigen jedoch starke nukleäre Lokalisationsmuster (Wilkinson et al, 1998). Die Untersuchungen der Assoziationen von Proteasomen mit subzellulären Strukturen erbrachte uneinheitliche Ergebnisse. In Zellkulturen von Nagern und Menschen wurde in Hepatozyten der Anteil der am

endoplasmatischen Retikulum lokalisierten Proteasomen auf weniger als 20% bestimmt. (Rivett et al. 1992). In Rattenleberzellen wurde für das 20S Proteasom eine nukleäre Verteilung von ca. 5%, eine mikrosomale Verteilung von ca. 11% und eine zytosolische Verteilung von ca. 83 % bestimmt, während Proteasom-PA700-Komplexe (PA700 Untereinheit S12-Antigen) eine nukleäre Anreicherung von 26% erreicht bei einem zytosolischen Anteil von nur etwa 53% (Brooks et al. 2000-1). Proteasomen interagieren normalerweise nicht mit Mitochondrien. In Leberzellen von Ratten, die unter Nahrungsmangel gehalten wurden, fanden sich jedoch Assoziationen von Mitochondrien und Proteasomen (Palmer et al. 1996). Für Immunproteasomen wurde eine stärkere Assoziation zum Endoplasmatischen Retikulum als bei Standardproteasomen gezeigt (Brooks et al. 2000 -2).

Es werden ebenfalls unterschiedliche Assoziationen von Proteasomen mit zytoskelettalen Bestandteilen beschrieben (Palmer et al. 1994). In HEK293- und HeLa-Zellen wurden Co-Lokalisationen mit dem zentrosomalen Markerprotein γ -Tubulin beschrieben, während keine Co-Lokalisation für das luminale Chaperon des Endoplasmatischen Retikulums BiP nachweisbar war (Wigley et al. 1999).

Die Assoziation von Proteasomen mit subzellulären Strukturen ist möglicherweise auch durch die lokale Degradation organellengebundener Proteine bedingt (Hirsch et al. 2000).

Untereinheiten von Proteasomen kommen auch als freie, nicht im Proteasomkomplex gebundene Monomere vor. Die Untereinheit Zeta mit Ribonukleaseaktivität wurde in bis zu 37% in freier Form in Nukleus und Zytoplasma nachgewiesen. Ein Austausch mit gebundenen Untereinheiten konnte nicht nachgewiesen werden (Joergsen et al. 1999). Ebenso existieren auch zahlreiche Vorläuferformen der Proteasomen, die vermutlich ebenfalls mit den meisten Anti-Proteasomenantikörpern reagieren (Nandi et al. 1997).

In verschiedenen Geweben von Ratten wurden unterschiedliche Verteilungen der Subgruppen der Proteasomen nachgewiesen. So fanden sich Immunproteasomen in hoher Konzentration im Milzgewebe, während sie im Gehirn fast nicht nachweisbar waren. Dort hingegen fand man fast ausschließlich Standardproteasomen, die nur wenig in der Milz vorkamen. Lunge und Leber zeigten eine Expression beider Entitäten (Noda et al. 2000). Unterschiede in der Verteilung von Proteasomen fanden sich verschiedenen Anteilen vom ZNS von Ratten (Mengual et al. 1996)

In gleichen Geweben ist die Zusammensetzung der Proteasomenentitäten auch vom Alter und Entwicklungszustand des Gewebes abhängig (Hong et al. 1994, Dahlmann et al. 2000).

2. Problemstellungen

Das Proteasomen ist entscheidend in die Regulation des Immunsystems, der Apoptose und des Zellzyklus einbezogen. Der Nachweis von Auto-Antikörpern gegen Proteasomen bei Patienten mit systemischen Autoimmunerkrankungen stellt somit einen hochinteressanten Befund dar, wobei die mögliche pathogenetische Bedeutung dieser Antikörper sowie deren immunologische Charakteristika bisher weitestgehend unklar sind.

Zur immunologischen und biochemischen Analyse ist eine Isolierung der humanen Anti-Proteasomenantikörper notwendig. Nach Affinitätsreinigung der Auto-Antikörper am Zielantigen 20S Proteasomen kann eine eindeutige Darstellung mittels immunologischer Standardmethoden erfolgen. Durch eine erfolgreiche Affinitätsreinigung, als weiteren unabhängigen Beweis für die Existenz von spezifischen Anti-Proteasomenantikörpern kann eine Quantifizierung der Antikörper ermöglicht werden. Die Affinitätsreinigung von humanen Auto-Antikörpern ist jedoch allgemein als methodisch anspruchsvoll bekannt. Dabei bedingt die Heterogenität der Auto-Antikörper ungewisse Affinitätseigenschaften zum Zielantigen. Darüber hinaus sind Stabilitätsprobleme und Veränderung der Bindungseigenschaften der Antikörper nach der Reinigungsprozedur zu erwarten.

Die Isolierung der Anti-Proteasomenantikörper kann eine Untersuchung der Antikörperreaktion in der indirekten Immunfluoreszenz, als einem der wichtigsten Standardverfahren in der serologischen Diagnostik von Autoimmunerkrankungen, ohne Überlagerung durch andere Antikörpermuster ermöglichen. Die indirekte Immunfluoreszenz stellt die Interaktionen zwischen Auto-Antikörper und Autoantigen an einem intakten, nicht denaturierten Antigen auf zellulärer Ebene dar. Daraus können Rückschlüsse auf ein möglicherweise charakteristisches Fluoreszenzmuster der Anti-Proteasomenantikörper gezogen werden. Weiterhin werden vergleichende Untersuchungen unter Einbeziehung von standardisierten poly- und monoklonalen Anti-Proteasomenantikörpern zur Prüfung der Spezifität und Kolo-kalisation ermöglicht. Die hierbei verwendeten Kulturzellen stellen jedoch ein artefaktanfälliges Modell der Interaktion dar. Daher ist der Nachweis der Spezifität und der

Reproduzierbarkeit der Reaktionen ein besonderer Aufgabenschwerpunkt der Arbeit. Untersuchungen in Zellkulturen mit verschiedenen Zelllinien könnten den Einfluss präparativer Faktoren bestimmen.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit bestand in der Evaluierung der indirekten Immunfluoreszenz als Screeningmethode für den Nachweis von Anti-Proteasomenantikörpern in Seren von Patienten mit rheumatischen Erkrankungen. Anhand der untersuchten Patientenserum können Aussagen über ein mögliches charakteristisches Anti-Proteasomen Fluoreszenzmuster, Maskierung und Überlappung der Fluoreszenz durch andere Auto-Antikörpermuster und Co-Lokalisation mit anderen zellulären Strukturen erwartet werden. Weiterhin wurden Zelllinien unter dem Einfluss von Interferon- γ mit der Folge einer Induktion von Immunoproteasomen bezüglich einer möglichen Abweichung im Fluoreszenzmuster untersucht. Da Autoimmunerkrankungen durch inflammatorische Prozesse gekennzeichnet sind, sollte hiermit die Möglichkeit der Demaskierung eines Neopeptopes am Proteasom abgeklärt werden.

Das Proteasom ist eine ubiquitäre multikatalytische Proteinase. Eine Alteration des Proteasomensystems hätte möglicherweise weitreichende Konsequenzen für die Immunmodulation sowie für eine Vielzahl von metabolischen Prozessen. Deshalb stellt sich die Frage, ob eine direkte Interaktion zwischen Antikörper und 20S Proteasomen zu einer Beeinflussung der proteolytischen Eigenschaften führen kann. In einem standardisierten Protease Assay kann somit unter Verwendung von affinitätsgereinigten humanen Anti-Proteasomenantikörpern diese Problematik erstmalig *in vitro* untersucht werden.

3. Materialien und Methoden

3.1. Klinische und serologische Charakterisierung der untersuchten Patienten

Die Affinitätsreinigung von Anti-Proteasomenantikörpern erfolgte aus Seren von Patienten der Klinik für Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Klinische und serologische Befunde wurden zur Charakterisierung der Patienten herangezogen. Ein positives Votum der Ethikkommission zur Durchführung der wissenschaftlichen Analysen wurde erteilt. Eingeschlossen wurden sieben Patienten mit positivem Nachweis von Anti-Proteasomenantikörpern, sowie ein Kontrollpatient mit negativem Ergebnis.

3.1.1. IgG-Isolierung aus Patientenserum

Zur reproduzierbaren und artefaktfreien Charakterisierung von Anti-Proteasomenantikörpern erfolgte eine Isolierung mittels Affinitätsreinigung. Da Immunglobuline der IgG-Klasse im Rahmen der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen besonders bedeutsam sind, wurde zunächst Gesamt-IgG der Patientenserum über Bindung an Protein G isoliert. Protein G-Säulen (0,5ml Protein-G High Trap[®], Amersham Pharmacia Biotech[®], Freiburg) wurden mit 10ml PBS pH7.4 gespült. Die Patientenserum wurden 10 min lang bei 5000 U/min zentrifugiert, mit Filter-Units (Sartorius[®] Minisart[®]) filtriert und 1:2 mit PBS pH 7,2 verdünnt. Das verdünnte Serum wurde mit einer Durchflussgeschwindigkeit von ca. 5µl/s durch die Säule gepumpt. Anschließend wurde die Säule mit 10 ml PBS gespült. Das Ablösen erfolgte mit je 5 ml 0,1 M Glycin-HCl-Puffer pH 2,7. Das Eluat wurde in fünf Fraktionen von je 1ml aufgefangen und sofort mit 50µl 1M TRIS-Puffer pH8 neutralisiert, in 1%FKS stabilisiert und auf den pH-Wert 7,2 eingestellt. Zur Konservierung wurden 3µl 1M Natriumazid hinzugefügt. Die Säule wurde zum Entfernen aller unspezifisch gebundenen Proteine mit 1ml 1M Essigsäure und 5ml PBS gespült. Die Reinheit der IgG-Isolierung wurde in einer nicht denaturierenden Natriumdodecylsulphat-Polyamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließender Coomassie Brilliant-Blau Färbung überprüft.

Die Konzentration der Antikörper in den gewonnenen Aliquots wurde photometrisch durch Messung der OD bei 280 nm bestimmt (Formel 6, Anhang 1). Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei 4°C bzw. bei -20°C.

3.1.2. Affinitätsreinigung der humanen Anti-Proteasomenantikörper

Zur spezifischen Aufreinigung von Anti-Proteasomenantikörpern wurden Proteasomen-Sepharosesäulen hergestellt. 300µg tiefkühlgetrocknetes Granulat CNBr-aktivierter Sepharose[®] 4B (Amersham Pharmacia Biotech[®], Freiburg) wurden in 1ml 1M HCl pH 2,5 gelöst. Additive wurden durch Spülen mit 60ml 0.001M HCl entfernt. Das Gel wurde in einer Filtersäule mit 4 ml 0,1M Carbonatpuffer (pH 8,3)/0,5M NaCl gespült. Proteasomen wurden nach Standardverfahren aus humanen Erythrozyten isoliert (O'Farrell et al. 1977). 200µg Proteasomen wurden in 4 ml Carbonatpuffer verdünnt und in der verschlossenen Säule zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt, mit 5 ml Carbonatpuffer gespült und mit 5 ml 0,1M TRIS-HCl Lösung (pH 8,0) zwei Stunden lang blockiert. Mit 5ml 0,1M Azetatpuffer/0,5M NaCl (pH 4,0) und mit 5ml 0,1M TRIS-Puffer/0,5M NaCl (pH 8,0) wurde dreimal alternierend gespült. Das Gel wurde mit 3 ml 0,1 M TRIS-Puffer/0,5 M NaCl (pH 8,0) überschichtet, die Säule wurde verschlossen und bei 4°C gelagert.

Zur Gewinnung der affinitätsgereinigten IgG-Fraktion wurde die Säule dreimal mit 4ml PBS pH 7,2; 2ml PBS (2-fach Konzentrat) pH 7,2 und 4ml PBS pH 7,2 alternierend gespült. Das Gel wurde mit den gereinigten IgG-Suspensionen bei Raumtemperatur jeweils 45 Minuten lang geschüttelt und mit 4ml PBS pH 7,2; 2ml PBS (2-fach Konzentrat) pH 7,2 und 4ml PBS pH 7,2 gespült.

Die spezifisch gebundenen Antikörper wurden mit 4 ml 0,1M Glycinpuffer pH 2,7 (alternativ 4 ml 0,1M Glycinpuffer pH 2,7 mit 2% Humanalbumin) abgelöst und in Fraktionen zu je 80 µl aufgefangen. Von den Fraktionen wurde die OD bei 280nm photometrisch gemessen bei einem Nullabgleich mit 0,1 M Glycinpuffer. Die Eluate wurden zu Aliquots zu je 1 ml gepoolt und mit je 50µl 2M TRIS-Puffer pH 8,5 und 0,1M NaOH neutralisiert, mit 1%FKS stabilisiert und mit je 3µl 1M Natriumazid konserviert. Für die Immunfluoreszenz wurden die humanen affinitätsgereinigten Antikörper auf Konzentrationen von etwa 50µg/ml verdünnt.

Die Säule wurde mit 4ml PBS pH 7,2; 2 ml PBS (2-fach Konzentrat) pH 7,2 und 4ml PBS pH 7,2 gespült und bei 4°C gelagert.

Gesamtproteinkonzentration, Serumelektrophorese und IgG-Konzentration der jeweiligen Patienten wurden nach Standardverfahren des Institutes für klinische Chemie der Charité bestimmt.

3.2. Monoklonale und polyklonale Referenzantikörper gegen Proteasomen

Die als Kontroll- und Referenzantikörper verwendeten monoklonalen Mausantikörper HP103, HP305, HP810 und HP901 wurden generiert, indem Mäusen 50µg humanes in Complete Adjuvant (Biogenes GmbH, Berlin, Deutschland) emulgiertes Proteasomprotein intraperitoneal appliziert wurde. Nach zwei Monaten wurden Boosterinjektionen mit Proteasomprotein ohne Adjuvanz durchgeführt. Ein Tag nach der letzten Boosterinjektion wurden Milzzellen entnommen und mit SP2/0-Ag14 Myelomzellen in einer Mischung mit Polyethylenglykol 4000 verschmolzen. Die Hybridomazellen wurden in RPMI-Medium inkubiert. Nach jeweils drei Tagen wurden 9ml Überstand abpipettiert, zentrifugiert und mit 1ml PBS gepuffert. Der Überstand wurde durch 9ml frisches Nährmedium ersetzt. Die Zelldichte wurde unter 10^6 Zellen/mm³ gehalten.

Die Antikörperproduktion der Hybridomazellen wurde in Solid-phase binding Assays überprüft, indem 0,9µg/ml Proteasomenlösung in Carbonatpuffer (pH 9,5) nach 3h Inkubation an Polystyrol Mikrotiterplatten (NUNC-Maxi-Sorb[®]) gekoppelt und mit 5% fetalem Kälberserum (FKS) in PBS blockiert wurden. Die Überstände wurden direkt auf die Mikrotiterplatten aufgetragen. Von den Antikörpern HP810 und HP903 wurde eine Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:20480 angefertigt und aufgetragen. Die Antikörper wurden mit biotinylierten Anti-Maus Fc spezifischen Ziegenantikörpern (SIGMA A-2179) markiert. Als Positivkontrolle diente der polyklonale Kaninchenantikörper MP3 in einer Verdünnung von 1:800. Die Quantifikation erfolgte mit einem Paranitrophenol enthaltenen Substratpuffer auf einem Mikrotiterplattenlesegerät.

Von den Antikörperpräparationen wurde ein Anti-Proteasomenantikörper-ELISA angefertigt. Jeweils 1 ml Antikörperlösung wurde direkt FITC markiert (Biogenes GmbH, Berlin, Deutschland; Egerer et al. 2002). Diese Antikörper wurden in der

Immunfluoreszenz in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Der monoklonale Anti-C2 Antikörper wurde von K.Tanaka (The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Japan) zur Verfügung gestellt und für die Immunfluoreszenz in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:200 verwendet.

Als polyklonale Kontroll- und Referenzantikörper wurden die AntiProteasomenantikörper MP1, MP3, K8 und K42 aus mit humanen Proteasomen immunisierten Kaninchen isoliert. Die Antikörper MP1, K8 und K42 wurden in der Immunfluoreszenz in einer Verdünnung von 1:10 verwendet, der Antikörper MP3 in einer Verdünnung von 1:100.

3.3. Antikörper zur Gegenfärbung definierter Zellstrukturen

Um eine mögliche Assoziation von Proteasomen mit definierten Zellstrukturen aufzudecken, wurden folgende Antikörper zur Gegenfärbung verwendet: Polyklonale Kaninchenantikörper gegen das ER-Markerprotein TAP1 und TAP2 (BIOCOR[®]), gegen das Markerprotein für ER und Golgi-Apparat BIP (DIANOVA[®]) sowie monoklonale Mausantikörper gegen das mitochondriale Hitzeschockprotein HSP60 (Stressgen Biotechnologies[®]), gegen den ER und Zellmembranmarker MHC1..

Als Anti-mitochondriales Referenzserum wurde ein Patientenserum mit positiver Reaktion gegen AMA-M2 im ELISA ohne Nachweis von Anti-Proteasomenantikörpern aus der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie der Charite, Berlin verwendet.

Als Sekundärantikörper wurde ein TRITC-markierter Kaninchen-Anti-Maus IgG-Fc Antikörper (DAKO[®]) in einer Verdünnung von 1:50, ein TRITC-markierter Schwein-Anti-Kaninchen IgG-Fc Antikörper (DAKO[®]) in einer Verdünnung von 1:20, ein FITC-markierter Esel-Anti-Kaninchen IgG-Fc Antikörper (Serammun[®]) in einer Verdünnung von 1:50, ein FITC-markierter Anti-Maus IgG-Fc Antikörper in einer Verdünnung von 1:100, ein TRITC-markierter Schwein-Anti-Human IgG-Fc Antikörper (DAKO[®]) in einer Verdünnung von 1:100 und ein Cy3-markierter anti-Maus IgG-Fc Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 verwendet.

3.4. Nachweis von Anti-Proteasomenantikörpern

3.4.1. ELISA zum Nachweis von Anti-Proteasomenantikörpern

Der Anti-Proteasomenantikörper-ELISA diente zum Screening der Patientenseren. Polystyrol Mikrotiterplatten (NUNC-Maxi-Sorb[®]) wurden mit 4µg/ml gereinigter Proteasomenlösung in Carbonatpuffer pH 9,5 für 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Verbleibende Bindungsstellen der Platte wurden 50 min lang mit Roti-Block (Roth Germany) blockiert. Ein stark positives Patientenserum diente zur Erstellung einer Standardkurve. Die Patientenseren wurden 1:100 in PBS/0,1%TWEEN20 (Serra[®], Heidelberg) pH 7,2 verdünnt und für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Sekundärantikörper diente ein Ziegen-anti-Human-POD markierter Antikörper (IMTEC[®], Berlin) in einer Verdünnung von 1:800 in PBS/0,1% TWEEN 20 pH 7,2. Gebundene Antikörper wurden durch 30min Inkubation mit TMB-Lösung sichtbar gemacht. Die Werte der optischen Dichte (OD) wurden photometrisch bei 450nm gemessen. Der Cut-off wurde aus 80 gesunden Personen bestimmt (<20 Units).

3.4.2. Immunoblot zum Nachweis von Anti-Proteasomenantikörpern

20S-Proteasomen wurden in einer denaturierenden SDS-Elektrophorese (SDS-PAGE) in einem 12,5%igen Polyacrylamidgel entsprechend Standardprozeduren aufgetrennt. Der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte im Semi-Dry-Verfahren. Nitrocellulosestreifen wurden eine Stunde lang in 5% Magermilch (Skim milk powder, Pharmacia[®]) blockiert.

Patientenseren und affinitätsgereinigte Anti-Proteasomenantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:200 über eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Der Referenzantikörper MP1 wurde 1:500, der Referenzantikörper K42 wurde 1:150 bis 1:250 verdünnt. Im anschließenden Waschschrirtt über je drei mal 20 Minuten in PBS-0,1%TWEEN wurden die nicht gebundenen Anti-Proteasomenantikörper entfernt. Als Sekundärantikörper diente ein POD-markierter anti-human Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000. Nach einem erneuten Waschschrirtt erfolgte der Nachweis einer Antikörperreaktion mittels Enzymchemilumineszenz (ECL).

3.5. Verwendete Zellkulturen zur Immunfluoreszenz

Zur Immunfluoreszenz wurden HeLa-Zellen (epitheloide Zellen, Zervixkarzinomzelllinie), SAOS-2 Zellen (humanes Osteosarkom) und HEP-2-Zellen (Plattenepithelzellen einer Larynxkarzinomzelllinie) verwendet.

Die HeLa-Zellen und SAOS-2-Zellen wurden in eigenen Kulturen gezüchtet. Die Klone waren in DMSO eingefroren verfügbar. Die aufgetauten Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in RPMI- Medium jeweils bis zu zwei Wochen bei 37°C inkubiert.

Zum Ablösen der Zellen wurde der Überstand abgesaugt, die adhärenen Zellen wurden mit sterilem PBS pH 7,2 gewaschen und durch Zugabe von jeweils 1ml Trypsin-EDTA abgelöst.

Je 0,5 ml der Zellsuspension wurde in Petrischalen mit Objektträgern inkubiert. Ein Teil der Objektträger wurde 48 h unter Zusatz von 100 U/ml IFN- γ inkubiert.

Aufgrund des langsamen Wachstums der SAOS-2 Zellen wurden diese mit Trypsin-EDTA abgelöst, 1:10 in sterilem PBS verdünnt und 5 min bei 800 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die verbleibende Zellsuspension wurde in 2 ml RPMI-Medium verdünnt und direkt auf die Objektträger getropft. Nach fünf Stunden Inkubation bei 37°C war der größte Teil der Zellen am Objektträger gebunden und konnte präpariert werden.

Die Objektträger mit den adhärenen Zellen wurden mit PBS abgespült und 10 min in 3,7 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Es wurde 3x5 min mit 50mM NH₄Cl in PBS sensibilisiert. Anschließend wurde in einer Waschlösung (PBS mit 0,01% Saponin und 0,25% Gelatine), der als Detergenz 0,1 % NP 40 zugesetzt wurde, 30 min permeabilisiert. Es erfolgte ein Waschgang von 20 min in der Waschlösung, danach eine Blockierung der Zellen mit 1% FKS für 30 min.

HEP-2-Zellen wurden als tiefgekühlte Fertigpräparate (The Binding Site® GmbH Heidelberg) wie in der Routine-ANA-Diagnostik üblich, verwendet.

3.6. Indirekte Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden 15 Minuten lang mit PBS unter Zusatz von 1% fetalem Kälberserum inkubiert. In den Voruntersuchungen zur Etablierung des Verfahrens wurden auch Blockierungen mit PBS/1% Fischgelatine, PBS/0,1% TWEEN und PBS durchgeführt.

Ca. 30µl Antikörperlösung wurden pro Sichtfenster auf die Zellen aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schutz vor Austrocknung wurde die Inkubation in feuchten Kammern durchgeführt. Es erfolgten unter ständigem Schütteln drei Waschschrte für jeweils fünf Minuten in PBS. In die erste Waschlösung wurde DAPI Lösung in einer Verdünnung von 1:20.000 zugefügt. Sekundärantikörper bzw. Antikörper bei Doppelfärbungen wurden in analoger Weise inkubiert. Die Objektträger wurden nach dem letzten Waschschrte mit einem Glycerinhaltigen Einbettungsmedium beschichtet und mit einem Deckglas bedeckt. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte unter Anregung mit 470 nm für FITC-markierte Antikörper, mit 552 nm für TRITC- und Cy3 markierte Antikörper und mit 380 nm für die DNA visualisierung durch DAPI.

3.7. Inhibitionstest der Antikörperbindung durch 20S-Proteasomen.

Als Kontrolltest für die Spezifität der affinitätsgereinigten humanen Anti-Proteasomenantikörper und der Referenzantikörper MP3 und K42 wurden deren Antigenbindungsstellen mit 20S Proteasomen blockiert und zu Färbungen in der Immunfluoreszenz verwendet. 20S Proteasomen (259 µg/ml) wurden in einem Verhältnis von 1:2 mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert und durch 90 minütige Inkubation bei Kühlschranktemperatur mit den humanen Anti-Proteasomenantikörpern und den Antikörpern MP3 und K42 präzipitiert und anschließend bei 12000 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Die Verdünnungen der Antikörper in den Lösungen war 1:50 bei Patient 1 und jeweils 1:2 bei allen anderen humanen Antikörpern. Die Verdünnung der Antikörper MP3 und K42 war jeweils 1:100. Der Überstand wurde zur IIF auf HEp-2 Zellen verwendet. Als Kontrolle wurden Lösungen der Antikörper in gleicher Konzentration mit Zugabe von PBS ohne Proteasomen inkubiert. Es wurde die Lichtemission in der Fluoreszenz durch

das Photometer des Mikroskops gemessen. Dazu wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop Zellen in ein Standardfeld eingestellt. Für jede Antikörperpräparation wurden je zehn Messungen durchgeführt. Aus dem Verhältnis der Mittelwerte der Emission der Färbungen mit inhibierten Antikörpern und der Kontrollen wurde ein Faktor gebildet, der das Maß der Inhibition reflektiert. Die Fluoreszenzbilder der Antikörper/ Proteasomenpräparationen und der jeweiligen Kontrollen wurden bei gleicher Belichtungszeit fotografiert.

3.8. Messung der Proteasomenaktivität

Die proteolytische Aktivität von 20S Proteasomen wurde unter dem Einfluss von Anti-Proteasomenantikörpern in einem standardisierten Protease Assay überprüft. Je 250 ng nativer Proteasomen wurden pro well in schwarze Mikrotiterplatten pipettiert. Antiproteasomen-Antikörper in Assay-Puffer (20 ml 1M TRIS/HCl + 5ml 2M KCl + 16 ml 0,5M MgCl₂ + 2ml 0,1M DTT + 0,4ml 0,1M EDTA, pH 8,0) wurden in steigenden Konzentrationen von 0 bis 90 µg/ml in jeweils gleichen Volumina hinzugefügt.

Nach zweistündiger Inkubation wurden jeweils gleiche Mengen des fluorogenen Substrates für die chymotrypsinähnliche Proteasefunktion der Proteasomen Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-Amino-Methylcoumarin (MCA) in 40 mM DMSO hinzugefügt. Durch die proteolytische Funktion der Proteasomen wurde im umgekehrten Verhältnis zu ihrer Inhibition MCA freigesetzt. Die Emission des freien MCA im 460nm Bereich bei Anregung mit 390nm wurde nach 30 min, 90 min und 20 Stunden gemessen.

4. Ergebnisse

4.1. Klinische und Serologische Charakterisierung der Patienten

Sieben anti-Proteasomenantikörper-positive Patienten und ein anti-Proteasomenantikörper-negativer Kontrollpatient wurden für die Affinitätsreinigung der Anti-Proteasomenantikörper in der vorliegenden Arbeit auf Grund ihrer Verfügbarkeit ausgewählt.

Bei den anti-Proteasomenantikörper-positiven Patienten konnten folgende Diagnosen gestellt werden: Eine Patientin mit Mischkollagenose (P1) (Sharp et al 1972 und 1979), ein Patient mit Fibromyalgie (P2) entsprechend Wolfe et al. (1990), zwei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes (P3 und P5) entsprechend Tan et al. (1982), ein Patient mit primärem Sjögren Syndrom (P4) entsprechend Vitali et al. (1993), eine Patienten mit autoimmuner Myositis (P6) entsprechend Bohan und Peter et al. (1975) und eine Patientin mit undifferenzierter Kollagenose (P7). Bei dem Anti-Proteasomenantikörper negativen Patienten (P8) wurde gemäß ACR-Kriterien ein SLE diagnostiziert (Tab. 2).

Die Patientin P1 stellte sich erstmals 1999 wegen unklarer Fieberschübe, allgemeiner Leistungsinsuffizienz, Arthralgien, Raynaud-Phänomen und einer Thrombose der Vena subclaviae vor. Im weiteren Verlauf traten zunehmende Muskelschmerzen und –schwäche bei serologisch erhöhten Myoglobinwerten auf. Eine klinisch anzunehmende interstitielle Pneumonie mit Dyspnoe und beidseits basaler Sklerophonie konnte in der Bildgebung bestätigt werden. In der Auto-Antikörperdiagnostik waren ANA in einem Titer von 1:2560 bei granulärem Muster positiv. In der Differenzierung konnten Anti-U1/RNP Antikörper sowie der Anti-Proteasomenantikörper nachgewiesen werden. Es wurde die Diagnose einer Mischkollagenose (MCTD) mit im Vordergrund stehender Lungen- und Muskelbeteiligung gestellt. Bei gesicherter Thrombose und positivem Nachweis von Anti-Cardiolipin-Antikörpern konnte weiterhin die Diagnose eines sekundären Antiphospholipidsyndrom gestellt werden. Unter zunächst intensiver immunsuppressiver Therapie mit Kortikosteroidbolustgabe und Einsatz von

Cyclophosphamid wurde ein rascher positiver Effekt erzielt. Auf Grund des Anti-Phospholipidsyndroms erfolgte die Einstellung auf eine orale Antikoagulation.

Die Patientin P2 stellte sich 1999 erstmals mit proximal betonten Muskelschmerzen und Angabe von Muskelverhärtungen insbesondere an den oberen Extremitäten vor. In der durchgeführten Diagnostik ergaben sich keine Hinweise auf das Vorliegen einer entzündlich-rheumatischen Grunderkrankung. Eine Muskelbiopsie lieferte keinen pathologischen Befund. Der ANA-Titer war mit 1:80 und einem dicht feingranulärem nukleären Muster diagnostisch nicht richtungweisend. Bei Nachweis einer positiven zytoplasmatischen Fluoreszenz waren jedoch interessanterweise Anti-Proteasomenantikörper im ELISA positiv. Auf Grund positiven Triggerpunkte konnte die Diagnose einer Fibromyalgie (FM) nach Wolfe et al. 1990 gestellt werden.

Bei Patient P3 war seit 1989 ein systemischer Lupus erythematoses (SLE) mit mesangioproliferativer Glomerulonephritis, Lungenbeteiligung, Serositis, Arthralgien, und Schmetterlingserythem bekannt. Da die Erkrankung trotz intensiver immunsuppressiver Therapie nicht beherrschbar war, erfolgte 1998 eine autologe Stammzelltransplantation. 1999 kam es jedoch zu einer Reaktivierung und Progression des SLE mit Haut-, Schleimhaut- und schwerwiegender Nierenbeteiligung. Serologisch änderte sich das ANA-Muster mit Nachweis einer granulären Fluoreszenz. In der Differenzierung waren Anti-dsDNA, Anti-Ro- und Anti-La-Antikörper nachweisbar. Weiterhin trat erstmals ebenfalls eine Reaktion gegen U1-RNP/Sm und Proteasomen auf.

Trotz wiederholter Stoßtherapien mit Cortison und Cyclophosphamid sowie einer erneuten immunablativen Therapie mit Fludarabin und Antilymphozytenglobulin konnte das Krankheitsbild nicht kontrolliert werden. Der Patient verstarb im Jahr 2002.

Bei Patientin P4 lag ein histologisch gesichertes primäres Sjögren Syndrom (pSS) mit typischer ausgeprägter Sicca-Symptomatik vor. Serologisch waren ANA in einem Titer von 1:5120 positiv. In der weiteren Differenzierung fanden sich neben den charakteristischen Anti-Ro(SS-A)- und Anti-La(SS-B)-Antikörper ebenfalls positive Rheumafaktoren und Anti-Proteasomenantikörper. Nach Auftreten einer Lymphadenopathie und Leukopenie wurde 1996 histologisch ein niedrigmalignes B-

Zell Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) gesichert. Dazu ist anzumerken, dass das Risiko für das Auftreten von NHL bekanntermaßen beim pSS gegenüber der Normalbevölkerung signifikant erhöht ist. Bei zunehmender Lymphadenopathie wurde 1999 histologisch ein blastenreiches B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom mit großer Wachstumsfraktion festgestellt und eine Chemotherapie mit Chlorambucil durchgeführt. Trotz der Chemotherapie konnte nur eine partielle Remission erzielt werden. Im weiteren Verlauf traten thrombembolische Komplikationen im Rahmen einer paraneoplastischen Gerinnungsstörung auf, die mit einer Fraxiparin behandelt wurden.

Bei Patientin P5 ist seit 1999 ein SLE mit Arthritis und Hautbeteiligung bekannt. Unter einer Glukokortikoidstoßtherapie sowie einer Immunsuppression bildete sich die Symptomatik rasch zurück. Im Juni 2004 kam es erneut zu einem Schub der Erkrankung. Eine kurzfristige Erhöhung der Steroiddosis sowie eine Dauertherapie mit Azathioprin (50mg/die) führten zu einer dauerhaften Remission. Im Laufe der Erkrankung traten eine Hypertonie sowie eine steroidinduzierte Osteoporose auf. ANA wurden in einem Titer von 1: 2560 mit homogenem Muster nachgewiesen. Ebenso traten zytoplasmatische Antikörper auf. In der Antikörperdifferenzierung konnten Anti-dsDNA-Antikörper, Anti-Ro-, Anti-La-, Anti-Sm- und Anti-Proteasomenantikörper nachgewiesen werden.

Bei der Patientin P6 traten 1998 erstmals Arthralgien auf. Zunächst wurde unter dem Verdacht einer rheumatoiden Arthritis mit Glukokortikoiden behandelt. Im weiteren Verlauf kam es jedoch zu einer progredienten Schwäche der proximalen Muskulatur und erythematösen Hautveränderungen. Eine durchgeführte Muskelbiopsie erbrachte die Diagnose einer autoimmunen Myositis. Serologisch waren ANA mit granulärem Muster und cytoplasmatische Antikörper auf HEp-2 nachzuweisen. In der Differenzierung konnten Anti-U1RNP, Anti-Jo1 und Anti-Proteasomenantikörper bestätigt werden. Die Therapie erfolgte mit Glukokortikoiden und Cyclophosphamid mit gutem Effekt.

Bei Patientin P7 wurde 1996 eine UCTD mit rezidivierenden generalisierten Arthralgien und Myalgien unter Beteiligung sämtlicher Gelenke der oberen Extremitäten sowie beider Knie und Sprunggelenke diagnostiziert. 1998 trat

letztmalig ein Krankheitsschub mit Druckschmerz und Schwellung an beiden Schulter- Knie- und Sprunggelenken auf. In der Serologie wurden ein ANA-Titer von 1:1280 bei feingranulärem Muster sowie ein positiver Anti-Proteasomen ELISA ermittelt. Die Patientin zeigte ein gutes Ansprechen auf eine Therapie mit Glukokortikoiden.

Im Rahmen der Auto-Antikörperdiagnostik wurden bei den einbezogenen Patienten anti-nukleäre Antikörper (ANA) auf HEP2-Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz bestimmt. Dabei wurden ANA-Titer größer 1:80 als positiv gewertet. Weiterhin wurden die ANA-Muster erfasst und eine entsprechende Auto-Antikörperdifferenzierung (ENA-Profil, extrahierbare nukleäre Antigene) inklusive Nachweis von Anti-Proteasomenantikörper im ELISA und Immunoblot durchgeführt (Tabellen 2 und 3).

Tab.2 Charakterisierung der untersuchten Patienten

Pat Nr.	Alter Geschlecht	Diagnose	ANA-Titer	ANA-Muster
1	30/w	MCTD	1:2560	Granulär, U1-RNP-Muster, cytoplasmatische Antikörper
2	54/w	FM	1:80	Dichtfeingranulär, cytoplasmatische Antikörper
3	42/m	SLE	1:2560	Granulär, U1-RNP Muster
4	53/w	pSS	1:2560	Feingranulär, Ro/La-Muster
5	54/w	SLE	1:2560	Homogenes Muster, cytoplasmatische Antikörper
6	38/w	Myositis	1:2560	Granulär, U1-RNP-Muster, cytoplasmatische Antikörper
7	48/w	UCTD	1:1280	Feingranulär
8	30/m	SLE	1:5120	Homogen

Tab.3 Auto-Antikörperprofil und Nachweis von Anti-Proteasomenantikörpern bei den untersuchten Patienten

Pat Nr.	ENA-Profil	Anti-Proteasomenantikörper ELISA in Units	APA Immunoblot, Banden in kDa
1	Anti-U1-RNP/Sm	95	negativ
2	negativ	>100	28
3	Anti-dsDNA, Anti-Ro/La Anti-U1-RNP/Sm	>100	negativ
4	Anti-Ro/La	16	30, 28, 20
5	Anti-dsDNA, Anti-Ro/La, Anti-Sm	5.5	30
6	U1-RNP/Sm, Anti-Jo1	58	negativ
7	negativ	84	28
8	Anti-dsDNA	12	negativ

4.2. Isolation und Quantifizierung der Anti-Proteasomen Antikörper

Gesamtproteinkonzentration, Serumelektrophorese und IgG-Konzentration der jeweiligen Patienten wurden nach Standardverfahren des Institutes für Klinische Chemie der Charité bestimmt (Tab. 4).

Die im Serum enthaltenen IgG wurden spezifisch an Protein G absorbiert. Dieser Schritt wurde der Affinitätsreinigung der Anti-Proteasomenantikörper zur Unterdrückung von Artefakten vorangestellt. Die gepoolten Eluate der IgG-Aufreinigung ergaben dabei Proteinmengen zwischen 7,4 und 14,3 mg pro Patient, die aus etwa 1ml Serum in einem Aufreinigungsschritt gewonnen wurden (Tab. 4). Dieser Wert war für jedes Serum relativ konstant und entspricht der anzunehmenden Sättigung der Protein G Säule. (Abb.: 2A). Die Ergebnisse der IgG- Aufreinigung wurden in der nicht-denaturierenden SDS-Gelelektrophorese überprüft. Auf dem Gel wurden 150 kDa Banden nachgewiesen, die dem Molekulargewicht von intaktem IgG entsprechen.

Die Affinitätsreinigung der IgG-Fraktion an nativen Proteasomen diente der Isolierung humaner Anti-Proteasomenantikörper. Diese gereinigten Antikörper ermöglichen eine wesentlich artefaktreduziertere Charakterisierung, da somit Hintergrundfärbungen durch unspezifisch reagierende Antikörper weitgehend ausgeschlossen sind. Die Fraktionen aus der Affinitätsreinigung enthielten zwischen 57 und 2367 µg/ml Immunglobulin. Der Verlauf der Elution bei der IgG-Isolierung und der Affinitätsreinigung entsprach der einer spezifischen Aufreinigung (Abb.: 2A und 2B). Entsprechend der mittels photometrischer Messung bestimmten Proteinkonzentrationen der gepoolten IgG-Eluate und der Aliquots der Affinitätsreinigung konnte der prozentuale Anteil der Anti-Proteasomenantikörper innerhalb der IgG-Fraktion orientierend kalkuliert werden. Aus dem relativen Anteil der Anti-Proteasomenantikörper im Gesamt-IgG und der IgG-Konzentration konnte die Konzentration der Anti-Proteasomenantikörper im Serum berechnet werden. Die eluierte Gesamtantikörpermenge war nach Affinitätsreinigung bei den Anti-Proteasomenantikörper positiven Patienten im Größenbereich zwischen 10 bis 100 mal höher als bei dem Anti-proteasomenantikörper negativen Kontrollserum. Dabei korrelieren die gemessenen Konzentrationen mit den ELISA Titern (Tab. 3, 4). Auch

die affinitätsgereinigten Anti-Proteasomenantikörper produzierten 150 kD-Banden in der nicht denaturierenden SDS-Elektrophorese (Abb. 2C).

Tab.4 Quantifizierung der Anti-Proteasomenantikörper in den Seren. Messung Gesamtprotein nach Biuret, γ -Globulinfraktion in der Serumelektrophorese und IgG-Konzentration im Ausgangsserum. Messung der Proteinmenge nach IgG-Isolierung mittels Protein G und der Affinitätsreinigung. Daraus können orientierend Anteil am Gesamt-IgG und Konzentration der Anti-Proteasomenantikörper (APA) im Serum berechnet werden. Die Quantifizierung der Anti-Proteasomenantikörper erfolgte entsprechend der im Anhang 2 aufgeführten Berechnungen.

Pat. Nr.	Gesamtprotein [mg/ml]	γ -Globulinfraktion [%]	Serum IgG [mg/ml]	IgG-Isolierung [mg]	Affinitätsreinigung [mg]	APA-IgG Anteil [%]	APA-Serumkonzentration [mg/ml]
1	61	31,2	19,0	13,52	2,367	17,5	3,3
2	72	18,0	12,9	12,7	1,019	8,2	1,04
3	58,2	29,9	17,4	14,3	0,079	0,55	0,096
4	65	19,0	12,3	10,50	0,046	0,43	0,053
5	40	27,7	10,8	10,88	0,176	1,62	0,18
6	67	26,4	17,7	12,4	0,078	0,63	0,11
7	58	21,5	12,4	7,4	0,057	0,77	0,096
8	n.d.	n.d.	n.d.	30,22	0,0097	0,032	0,0032

4.3. Generierung und Spezifitätskontrolle der monoklonalen und polyklonalen Anti-Proteasomenantikörper

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden insgesamt fünf verschiedene monoklonale sowie vier polyklonale Anti-Proteasomenantikörper gegen natives humanes 20S Proteasom als Referenzantikörper verwendet.

Die Antikörperproduktion in den jeweiligen Hybridomaklonen wurde mittels ELISA ermittelt. Dazu wurden die Überstände der Hybridomakulturen jeweils in 48-stündigen Intervallen abpipettiert und in einem spezifischen Anti-Proteasomenantikörper-ELISA untersucht. Die Hybridomaklone der hier untersuchten Linien HP103 und 305 reagierten beide deutlich im ELISA mit etwa 500 AU im jeweils reaktivsten Aliquot. Die absolute Reaktivität war in beiden Klonen vergleichbar. Die Antikörperproduktion beider Klone nahm nach einigen Tagen deutlich ab. Mit der Verdünnungsreihe der Überstände der Klone HP810 und HP903 wurde ebenfalls ein Anti-Proteasomenantikörper ELISA durchgeführt, der bis zu

einer Verdünnungsstufe von 1:160 positiv war. Die Antikörper HP810 und HP 901 zeigten dabei im ELISA eine starke Reaktion von etwa 1400 AU. Die Spezifität der generierten Antikörper gegenüber humanen 20S Proteasomen wurde durch Immunopräzipitation mit ³⁵S-Methioninhaltigen Proteasomen überprüft (persönliche Mitteilung U.Kuckelkorn). Die monoklonalen Antikörper wurden über 1 ml-Protein G-Säulen (Amersham) isoliert und auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Der Antikörper Anti-C2 wurde durch K. Tanaka charakterisiert und kann von Affiniti®/Biomol bezogen werden.

Die Reaktivitäten der polyklonalen Kaninchen-Referenzantikörper MP1, MP3, K08 und K42 wurden im ELISA und Immunblot gegen humane 20S Proteasomen überprüft.

4.4. Untersuchungen in der direkten und indirekten Immunfluoreszenz (IIF)

4.4.1. Charakterisierung der monoklonalen Antikörper in der Immunfluoreszenz

Mit den monoklonalen Anti-Proteasomenantikörpern HP103, HP305, HP810, HP903 und Anti-C2 wurde eine indirekte Immunfluoreszenz zur Bestimmung der positiven Titerstufen durchgeführt. Die Antikörper des Klons HP810 waren bis zur Verdünnungsstufe 1:100 stark positiv und ab der Verdünnung 1:500 negativ. Die Antikörper des Klons HP903 waren bis zur Verdünnungsstufe 1:100 schwach positiv und ab der Verdünnungsstufe 1:500 negativ. Die Antikörper der Zellklone HP103 und HP305 waren in allen Verdünnungsstufen ab Verdünnungsstufe 1:1 negativ (Tab. 5). Der monoklonale Anti-C2 Antikörper zeigte in den Verdünnungstufen 1:10 bis 1:20 eine deutliche Reaktivität.

Die direkt mit FITC markierten Antikörper HP810 und HP903 waren in der IIF bis zu einer Verdünnung von 1:320 positiv.

Tab. 5 Titerbestimmung verschiedener monoklonaler Anti-Proteasomenantikörper aus Kulturüberständen in der IIF

	1:1	1:10	1:20	1:100	1:500	1:1000
HP103	-	-	n.d.	-	n.d.	-
HP305	-	-	n.d.	-	n.d.	-
HP810	n.d	+++	+++	++	-	-
HP903	n.d	+++	++	+	-	-
Anti-C2	n.d	+	+	-	-	-

4.4.2. Analyse des Immunfluoreszenzmusters von Anti-Proteasomenantikörpern

Untersuchungen zur Darstellung eines Proteasomenmusters wurden mittels Immunfluoreszenz auf kultivierten HeLa und SAOS-2 Zellen sowie auf kommerziell erhältlichen, fixierten HEP-2 Zellen durchgeführt. Dabei wiesen alle Zellen zunächst Gemeinsamkeiten in der Proteasomendistribution in den Zellkompartimenten auf. Die Darstellung des Proteasomenmusters von HeLa-Zellen und SAOS-2-Zellen unterschieden sich interessanterweise jedoch in ihrer Feinstruktur reproduzierbar von den Mustern der HEP-2 Zellen.

Das Proteasomenmuster auf HEP-2 Zellen war bei allen untersuchten Anti-Proteasomenantikörpern durch die Darstellung von zwei Komponenten im Zytoplasma charakterisiert. Dabei fiel zunächst ein unterschiedlich intensiv ausgeprägtes, dicht feingranuliertes Muster auf, das sich gleichmäßig über das gesamte Zytoplasma hin erstreckt. In diesem Muster ist keine strukturelle Beziehung zu einem bestimmten Zellbestandteil erkennbar. Bei größter Vergrößerung lassen sich kleine, punktförmige Granula erkennen (Abbildung 3D und 5B Patient 1 und 5). Als zweite Struktur zeigte sich zusätzlich im Zytoplasma eine relativ grob verteilte Struktur von Filamenten, die sich von den Zellpolen aus um den Kern herum verdichtet. In unmittelbarer Zellkernnähe sind die Einzelheiten des Musters aufgrund von Überlagerungen kaum auszumachen. Der Zellkern selbst blieb von den Filamenten ausgespart. Auffällig an dieser filamentären Struktur sind zahlreiche Verzweigungen in peripheren Bereichen der Zelle (Abb. 3A, B, C, D und E (Pfeil 4), 4D und E, 5 Reihe B).

Der Nukleus stellte sich bei den HEP-2 Zellen mit einem dicht feingranulären, feingefaserten Muster dar, das sich zur Kernmembran hin abschwächt. Im Bereich

der Kernmembran selbst war jedoch regelmäßig eine besonders deutliche Anfärbung zu erkennen (Abb. 3 und 4 Spalte I). Die Nukleoli waren durch das Muster ausgespart und selbst meist nicht angefärbt (Abb. 3A, D und E Pfeil 1, 5 Reihe B, 6A und C). In deren unmittelbarer Nachbarschaft erreicht die Intensität der Kernfärbung ein Maximum (Abb. 3E Pfeil 2). Auf HEp-2 Zellen kam es sonst innerhalb des Zellkerns zu keiner nachweisbaren Assoziation zu weiteren Kernstrukturen.

In Abbildung 3E werden in einem Falschfarbenbild die Charakteristika des Proteasomenmusters auf HEp-2 Zellen besonders deutlich dargestellt. Rote Strukturen zeigen dabei Zellregionen mit besonders intensiver Fluoreszenz. Zusammengefasst konnte somit neben der Darstellung einer zu erwartenden charakteristischen Proteasomendistribution im Zytoplasma und Zellkern mit feingranulärem Muster eine ungewöhnliche Assoziation zu filamentären Zellstrukturen nachgewiesen werden.

4.4.3. Zuordnung der Proteasomenlokalisationen zu bestimmten Zellstrukturen

Um die hier beschriebenen Strukturen zu korrespondierenden Zellstrukturen zuordnen zu können, wurden in Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen definierte Zellbestandteile und Anti-Proteasomenantikörpern die dargestellten Zellbestandteile verglichen. Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen die ER-Markerproteine TAP1, TAP2 und BIP (Abb. 4B) sowie gegen MHC-I Moleküle (Abb. 4C) und den monoklonalen Anti-Proteasomenantikörper HP 810 und HP 903 ergaben Co-Lokalisationen mit den um die Kernmembran gruppierten filamentösen Strukturen. Gegenfärbungen mit dem DNA-spezifischen Farbstoff DAPI haben gezeigt, dass diese Filamentstruktur außerhalb des Kerns liegt, jedoch in enger Beziehung zur Kernmembran steht.

Die Zellmembran wurde jedoch ausschließlich durch Anti-MHC-I Antikörper angefärbt (Abb. 4C). Die Anfärbung des ER hebt den scholligen Aspekt dieser Struktur in der Immunfluoreszenz hervor (Abb. 4B). Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen das mitochondriale Markerprotein HSP60 sowie mit Seren von AMA-M1 positiven Patienten und den monoklonalen Anti-Proteasomenantikörpern HP810 und HP903 zeigten eine Co-Lokalisation mit den verzweigten filamentären Strukturen, die in der Zellperipherie besonders deutlich zur Darstellung kamen (Abb. 4D und E).

Somit stellt sich durch diese Färbungen dar, dass Proteasomen in HEP-2 Zellen mit Strukturen assoziiert sind, die sich im Zytosol und an oder in unmittelbarer Nachbarschaft vom Kernmembran/ ER Komplex, den Mitochondrien und von Strukturproteinen des Zellkerns befinden.

4.4.4. Besonderheiten in den Färbungen

Anti-Proteasomenantikörper wiesen zwar im Allgemeinen die oben genannten Merkmale auf, es traten jedoch auch reproduzierbare Unterschiede zwischen verschiedenen Antikörpern auf. Dabei schien es nicht entscheidend zu sein, von welcher Spezies der Antikörper stammt oder ob er monoklonal oder polyklonal ist.

Das Verhältnis der Intensität der Fluoreszenz von Kern und Zytoplasma zeigte auf HEP-2 Zellen Unterschiede bei verschiedenen Antikörpern, jedoch auch bei Zellgruppen innerhalb der Kultur bei gleichem Muster. Meist war das Färbungsverhältnis ausgewogen. Der polyklonale Kaninchenantikörper K42 zeigte eine Kernfärbung, die über der Intensität der Färbung im Zytoplasma lag (Abb. 8A). Im Gegensatz dazu zeigten die monoklonalen Antikörper HP810, HP903 und anti-C2 jedoch durchgehend eine schwache Kernfärbung (Abb. 3 B und C). Artefakte durch Beschädigungen der Zellkerne konnten durch Gegenfärbungen mit DAPI ausgeschlossen werden.

Ebenso wurden die filamentären Strukturen und die dicht feingranuläre zytoplasmatische Fluoreszenz von verschiedenen Antikörpern unterschiedlich angefärbt. Darüber hinaus war die Ausprägung der jeweiligen Strukturen auch abhängig von der Beschaffenheit der Kulturzellen, da die Betonung der einen oder anderen Komponente selbst innerhalb einer Färbung zwischen verschiedenen Zellen unterschiedlich war. Bemerkenswerterweise erscheint das dicht feingranuläre Muster besonders intensiv bei hoher Konfluenz der Zellen (Abb. 3D und 8A), während sich das filamentäre Muster besonders an isoliert wachsenden Zellen in der Kulturperipherie darstellt (Abb. 3A, B und C). Beide Muster waren nahezu in allen Zellen bei Färbungen mit allen Antikörpern nachweisbar. Jedoch zeigte sich, dass insbesondere der Kaninchenantikörper K42 und die gereinigten Antikörper von den

Patientenserum 1 und 5 das dicht feingranuläre zytoplasmatische Muster besonders deutlich anfärbten (Abb. 8A und 5B), dagegen färbten die monoklonalen Antikörper HP810 und HP903, der monoklonale Mausantikörper anti-C2 und die Patientenserum 2, 3, 4, 6 und 7 besonders intensiv das filamentäre Muster (Abb. 3B, C und 5).

Der monoklonale Mausantikörper anti-C2 färbte als einziger Antikörper stets die Nukleoli deutlich an (Abb. 3B). Auch bei den monoklonalen Antikörpern HP810 und HP903 waren die Nukleoli dezent angefärbt. Auffällig war, dass insbesondere der Antikörper K42 bei der Konkurrenz der Bindungsstellen der Proteasomen auf HEP-2 Zellen eine Reduktion für alle beschriebenen Proteasomenmerkmale aufwies, wobei die Fluoreszenz der Nukleoli nicht reduziert wurde (Abb. 8A).

Insgesamt war somit ein charakteristisches Proteasomenmuster nachweisbar, die komplexe Natur des Proteasomensystems spiegelt sich jedoch auch in heterogenen Färbecharakteristika wider.

4.4.5. Immunfluoreszenz affinitätsgereinigter Antikörper und ihrer Ausgangsseren im Vergleich

Da ein ANA-Muster ein Überlagerungsbild aller im Serum vorkommenden antinukleären Antikörper darstellt, ist es von Interesse zu untersuchen, ob in klinischen Fällen ein Proteasomenmuster in diagnostischen Färbungen zu identifizieren ist bzw. in welchem Maße Überlagerungen durch andere Antikörper eine Rolle im Färberesultat spielen. Daher wurden in den Untersuchungen der Immunfärbungen die affinitätsgereinigten humanen Anti-Proteasomenantikörper mit den ANA-Mustern ihrer Ausgangsseren verglichen. Dabei zeigte sich bei einigen Seren das Muster, das mit den gereinigten Antikörpern und den Referenzantikörpern dargestellt wurde. So zeigten die Muster der Seren der Patienten 1, 4 und 5 deutlich die Merkmale von Proteasomenmustern. Interessanterweise wurde bei den Seren 2, 3, 6 und 7 dieses Muster stark von anderen Mustern überlagert. In diesen Fällen wurde das Proteasomenmuster erst durch die Affinitätsreinigung der Antikörper demaskiert (Abb.5)

Das Proteasomenmuster kann also als einziges bzw. als dominantes Muster bei ANA Färbungen vorkommen, es kann aber auch stark von anderen Mustern überlagert werden.

4.4.6. Immunfluoreszenz von Anti-Proteasomenantikörpern auf anderen Zelllinien

Inwiefern die auf HEP-2 Zellen gemachten Beobachtungen auch auf andere Zellen übertragbar sind, wurde auf HeLa und SAOS-Zellen aus Zellkulturen überprüft. Diese Zellen zeigten, wie auch die Färbungen der HEP-2-Zellen, eine Verteilung der Antikörper in Kern und Zytoplasma. Die Bindung an strukturellen Zellbestandteilen war bei HeLa und SAOS-Zellen jedoch nur sehr schwach ausgeprägt, und die Zellen zeigten abhängig von den Kulturbedingungen stärkere Variationen der erzielten Muster. Dabei stimmten die Resultate der Färbungen bei allen verwendeten Antikörpern (HP810, HP903, anti-C2 sowie dem Serum von Patient 2) weitgehend überein, was die Validität der Beobachtungen belegt.

Bei beiden Zelllinien zeigte sich eine dicht feingranuläre zytoplasmatische Färbung ohne Darstellung filamentöser Strukturen.

Insbesondere bei großen Zellen fanden sich im Zytoplasma vakuolenartige Strukturen, die teilweise intensiv, teilweise auch nicht angefärbt wurden. Gelegentlich wurden schollige Strukturen in unmittelbarer Nachbarschaft des Zellkerns durch die Antikörper HP903, HP810 und MP3 angefärbt, die stark an die ER-Färbungen der HEP-2 Zellen erinnerten (Abb.6C und 7).

Die Färbung des Zellkerns bei HeLa- und SAOS-2 Zellen war in Ihrer Struktur der Zellkernfärbung der HEP-2-Zellen sehr ähnlich. Auch hier dominierte eine dicht feingranulierte Verteilung der Fluoreszenz ohne Anfärbung der Nukleoli. In individuellen Zellen variierten die Kernfärbungen jedoch teilweise erheblich, wobei eine Abhängigkeit von der Dichte des Bewuchses auf dem Objektträger sowie von dem Alter der Zellen und dem Grad der Konfluenz der Zellgrenzen beobachtet werden konnte. Zellen aus frischen Zellkulturen (maximal 80% Konfluenz) und Zellen aus Zonen geringer Zelldichte zeigten eine dicht feingranuläre Färbung der Nuklei mit Aussparung der Nukleoli. Die Intensität der Kernfärbung war meist stärker, als die Färbung im Zytoplasma. Zellen aus Kulturen mit 100% Konfluenz und aus Zonen

mit dichtem Bewuchs zeigten nur eine schwache Färbung im Kern, dafür jedoch eine stärkere Färbung im Zytoplasma. (Abb. 6)

In einigen HeLa Zellen waren größere punktförmige Anfärbungen mit den Antikörpern HP903 und MP3 im Zellkern groß gewachsener Zellen erkennbar (Abb. 6C). Da in den beschriebenen HeLa- und SAOS-Zellen das gesamte Entwicklungsspektrum der Zellen beobachtet wurde, kommen hier zellzyklus-abhängige Besonderheiten deutlicher zur Darstellung.

Es wurden Doppelfärbungen mit direkt FITC markierten HP903-Antikörpern und MP3-Antikörpern auf HeLa und SAOS-2 Zellen durchgeführt, um zu ermitteln, ob die beobachteten Unterschiede zwischen den Zellen antikörper- oder zellspezifisch sind. Alle untersuchten Anti-Proteasomenantikörper co-lokalisieren in diesen Doppelfärbungen. Dies ist eine Bestätigung der Spezifität der Antikörper und Reproduzierbarkeit des Proteasomenmusters (Abb. 7).

4.4.7. Ein möglicher Einfluss von Interferon- γ auf das Proteasomenmuster

Die Expression der Immuno-Proteasomen ist von der Induktion durch Zytokine abhängig. Ob sich derartige Faktoren auf die Fluoreszenzmuster von Anti-Proteasomenantikörper auswirken, wurde durch Färbungen von HeLa-Zellen, die 24 Stunden lang mit 100 U/ml Interferon- γ inkubiert wurden, überprüft. Diese Zellen zeigten im Gegensatz zu Färbungen der Kontrollen ohne Interferon- γ mit den Antikörpern HP810, HP903, MP1, K8, K42 und C2 insbesondere im Kern eine schwächere Färbung. Es waren auch morphologische Unterschiede zu erkennen. Unter Einfluss von Interferon- γ war die Zelldichte geringer, die Zellen selbst waren jedoch größer. In den Kontrollen waren mehr Zellen mit gefärbten Zellkernen enthalten, von denen sich ungefärbte Nukleoli abhoben. Eine Inkubation mit Interferon- γ führte nicht zu einer Änderung des Proteasomenmusters, es wurden jedoch morphologische Unterschiede in diesen Zellen beobachtet. Inwieweit diese Unterschiede jedoch ausschließlich durch den Einfluss des Interferon- γ hervorgerufen wurden, ist nicht weiter untersucht worden.

Alle Sekundärantikörper wurden in Kontrollfärbungen untersucht. Zur Auswertung wurden nur Sekundärantikörper ohne oder mit nicht signifikanten Hintergrundfärbungen verwendet.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ein spezifisches und reproduzierbares Proteasomenmuster existiert. Die Ausprägung dieses Musters ist jedoch abhängig von einer Vielzahl von Faktoren. Die komplexe Natur des Proteasomenmusters erschwert zudem die Abgrenzung von anderen zytoplasmatischen und nukleären Mustern, insbesondere dann, wenn überlagernde Antikörper vorhanden sind.

4.5. Blockierung unspezifischer Bindungsstellen der Kulturzellen

In Kontrollexperimenten wurden Färbungen mit verschiedenen Blockierungsmedien untersucht. Die Auswahl des Blockierungsmediums wirkte sich sowohl auf die Intensität der Fluoreszenz als auch auf die Charakteristik des Musters aus. Die Blockierung mit 2,5% FKS führte zu einer absoluten Reduktion der Intensität der Fluoreszenz um durchschnittlich 53% auf HEp-2 Zellen und 44% auf HeLa Zellen, die Blockierung mit 1% Fischgelatine zu einer durchschnittlichen Reduktion um 50% auf HEp-2 Zellen und 43% auf HeLa Zellen. Das Fluoreszenzmuster änderte sich nicht bei HeLa Zellen. Auf HEp-2 Zellen blieb das Fluoreszenzmuster der Anti-Proteasomenantikörper bei Blockierung mit Fischgelatine unverändert, bei Blockierung mit FKS wurde die Intensität der Fluoreszenz im Kern jedoch relativ vermindert. Unterschiede zeigten sich auch bei Färbungen mit kompletten Seren mit bzw. ohne Blockierung mit FKS. Diese Unterschiede waren besonders deutlich bei hochtitrigen Antikörperkonzentrationen, wenn das in den Seren enthaltene humane Serumalbumin stark verdünnt wurde. Für die Durchführung der weiterführenden Untersuchungen wurde FKS verwendet, da dieses dem Humanalbumin am ähnlichsten ist und damit am ehesten den Bedingungen der klinischen Antikörperdiagnostik entspricht. Um unspezifische Reaktionen auszuschließen wurden Kontrollfärbungen mit allen Sekundärantikörpern durchgeführt. Somit lassen

sich die Beobachtungen nur auf das spezifische Reaktionsverhalten der Primärantikörper zurückführen.

4.6. Konkurrenz der Antikörperbindungsstellen durch 20S-Proteasomen

Zum Beweis der Spezifität der Reaktivität der gereinigten Antikörper gegen 20S-Proteasomen wurde eine Immunfluoreszenz mit den gereinigten Antikörpern durchgeführt, die mit nativem 20S-Proteasomen vorinkubiert wurden. Für die Kontrollen wurde statt Proteasomen nur PBS zu den Antikörpern hinzugegeben. Die Bindungsstellen der spezifisch reagierenden anti-proteasomalen Antikörper wurden durch die Proteasomen blockiert. Das Experiment determiniert, in welchem Maße die untersuchten Antikörper mit Epitopen von Proteasomen reagieren.

Mit dem Photometer des Fluoreszenzmikroskops wurden die Belichtungszeiten für jeweils sechs Gesichtsfelder in jeder Färbung mit und ohne Präinkubation mit Proteasomen gemittelt (Tab 6). In einem zweiten Schritt wurden die Muster der korrespondierenden Antikörper für einen visuellen Vergleich mit und ohne Präinkubation bei gleicher Belichtungszeit fotografiert (Abb.8). Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Reduktion der Fluoreszenz sowohl bei den gereinigten humanen Anti-Proteasomenantikörpern (Tab. 6) als auch bei dem polyklonalen Kaninchenantikörper K42 (48%). Keine signifikante Reduktion der Fluoreszenz im Sinne einer Konkurrenz konnte bei der Negativkontrolle (Pat.Nr. 8) nachgewiesen werden (Reduktion um 7%). Die Reduktion der Fluoreszenz zeigt sich zum einen in der Verlängerung der nach Formel 7 berechneten Belichtungszeiten für die untersuchten Gesichtsfelder (Tab. 6) als auch in einer deutlich geringeren Fluoreszenzintensität der blockierten Antikörper im Vergleich zur Kontrolle in den Fotografien, die bei gleichen Belichtungszeiten entstanden sind (Abb.8).

Tab. 6: Konkurrenz der humanen affinitätsgereinigten Anti-Proteasomenantikörper durch native 20S-Proteasomen. Darstellung der prozentualen Verminderung der Fluoreszenz nach Konkurrenz gegenüber Fluoreszenz der Antikörper ohne Konkurrenz durch 20S Proteasomen.

Pat Nr.	1	2	3	4	5	6	7	K 42	Neg.kontr.
Konkurrenz durch Proteasomen in %	55	67	52	n.d.	31	57	15	48	7
Durchschnittliche Belichtungszeit ohne Konkurrenz	2,6	6,4	13,2	n.d.	21,7	38,8	1,64	1,2	1,2
Durchschnittliche Belichtungszeit mit Konkurrenz	5,7	19,5	27,4	n.d.	31,4	90,4	1,94	2,3	2,3

In einem zweiten Versuch wurde die Konkurrenz des direkt FITC-markierten monoklonalen Antikörpers HP810 und des polyklonalen Antikörpers MP3 um Epitope von Proteasomen in Doppelfärbungen überprüft. Interessanterweise war die Fluoreszenz der FITC-markierten monoklonalen Antikörper deutlich intensiver, wenn diese vor dem polyklonalen Antikörper inkubiert wurden, während sich die Reihenfolge der Inkubation nicht auf die Fluoreszenz des polyklonalen Antikörpers auswirkte. In Kontrollexperimenten zeigten die verwendeten TRITC-markierten Anti-Kaninchen Sekundärantikörper keine signifikante Kreuzreaktion gegen die monoklonalen Mausantikörper. Die Reihenfolge der Inkubation kann bei Doppelfärbungen mit zwei Anti-Proteasomenantikörpern einen Einfluss auf das Färberegebnis haben.

4.8. Protease Assay

Neben der Quantifizierung und dem Nachweis der Anti-Proteasomenantikörper stellt sich die Frage nach der Bedeutung dieser Antikörper im Sinne ihrer physiologischen oder pathologischen Funktion. Ein wichtiger Schritt zur Klärung dieser Frage ist die Untersuchung des Einflusses dieser Antikörper auf die Funktion ihrer Antigene, der 20S-Proteasomen. In dem dazu durchgeführten Protease Assay wurden mit Anti-Proteasomenantikörpern inkubierte 20S-Proteasomen untersucht. Die nach 30 min, 60 min und 20 h gemessene Fluoreszenz-Emission des vom Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA-Konjugats abgespaltenen MCA zeigte einen kontinuierlichen Anstieg gemäß der zu erwartenden proteolytischen Aktivität der Proteasomen von etwa 0,5

Fluoreszenzeinheiten nach 30 min auf etwa 1 Fluoreszenzeinheit nach weiteren 60 min. Es gab jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Geschwindigkeit der MCA Freisetzung zwischen den Ansätzen mit und ohne Anti-Proteasomenantikörpern. Ebenso gab es nur geringe Variationen zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Antikörper (Abb. 9).

Die isolierten anti Proteasomen-Antikörper blockieren die proteolytische Aktivität des Proteasoms nicht.

5. Diskussion

Der Nachweis von Auto-Antikörpern ist das wichtigste Werkzeug in der Diagnostik von Autoimmunerkrankungen. Zahlreiche Veröffentlichungen illustrieren die Bedeutung von Auto-Antikörpern sowohl in der Pathogenese als auch in der Diagnostik von Autoimmunerkrankungen. Die vorliegenden Erkenntnisse zeigen die Bedeutung der Erforschung des Proteasomensystems als Autoantigen in diagnostischer und pathogenetischer Hinsicht.

Mit dieser Arbeit werden die Erkenntnisse vorangehender Arbeiten vertieft, in denen mittels ELISA, Immunoblot und zweidimensionaler Gelelektrophorese das 20S Proteasom als Autoantigen identifiziert wurde. Erstmals wurden humane Anti-Proteasomenantikörper affinitätsgereinigt, quantifiziert und in der indirekten Immunfluoreszenz charakterisiert. Die indirekte Immunfluoreszenz auf HEP-2 Zellen ist ein wichtiges und gut etabliertes Standardverfahren. Es wurden hierzu die dargestellten Fluoreszenzmuster beschrieben und mit den Fluoreszenzmustern von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern gegen verschiedene Proteasomenuntereinheiten in Doppelfärbungen verglichen. Hierbei konnten genaue Merkmale von Proteasomenmustern auf HEP-2 Zellen dargestellt werden. In weiteren Experimenten wurde die Spezifität der humanen Anti-Proteasomenantikörper in Kompetitionsreaktionen belegt. In Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen ER-Proteine, MHC-1-Moleküle und Mitochondrienproteine wurden Assoziationen von Proteasomen zu bestimmten Zellstrukturen bestimmt.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Experimente bestand in der Untersuchung von möglichen Wechselwirkungen zwischen Auto-Antikörpern und Antigenen.

Mit dieser Arbeit wurden neue Erkenntnisse über diese Antikörper gewonnen und vor allem ihre Bedeutung als diagnostischer Marker gezeigt.

5.1. Humane Anti-Proteasomenantikörper wurden erstmals isoliert und charakterisiert

Es gelang erstmals, humane Anti-Proteasomenantikörper zu isolieren und in Reinform zu charakterisieren. Für die Spezifität der gereinigten Antikörper gibt es mehrere Kontrollexperimente. Die Ergebnisse der photometrischen Untersuchung der IgG-Isolation und der Affinitätsreinigung zeigten einen für eine spezifische Reinigung typischen Verlauf. In einer nicht-reduzierenden, denaturierenden SDS-Gelelektrophorese wurden für intaktes IgG typische Banden in diesen Eluaten nachgewiesen. Mittels ELISA wurden proteasomenspezifische IgG nachgewiesen und quantifiziert. Die Gemeinsamkeiten der gereinigten Antikörper in den Färbemerkmalen in der IIF sowie deren Blockierbarkeit mit nativem humanem 20S Proteasom unterstützen die Annahme, dass es sich hierbei tatsächlich um spezifisch reagierende Anti-Proteasomenantikörper und nicht um kreuzreagierende Antikörper handelt. Sowohl in der Immunfluoreszenz als auch bei dem Blockierungsversuch reagierten die untersuchten Antikörper mit nativem, nicht denaturiertem Proteasom. Dieses Modell ist daher den physiologischen Bedingungen sehr ähnlich und Reaktionen mit Epitopen, die durch Denaturierungsprozesse entstanden oder exponiert wurden, sind so weitgehend ausgeschlossen worden.

Die Berechnungen zur Quantifizierung zeigten einen überraschend hohen Anteil der anti-proteasomalen IgG-Antikörper im Gesamt-IgG der Seren. Der berechnete Anteil korrelierte mit dem jeweils bestimmten ELISA Titer. Diese Befunde zeigen, dass diese Antikörper bei bestimmten Patienten einen bedeutenden oder mitunter den größten Anteil der autoreaktiven Antikörper stellen können. Dieser Befund unterstreicht die Rolle der Anti-Proteasomenantikörper als quantitativ wichtigen Auto-Antikörper und bestätigt Aussagen von Arbeitsgruppen, die Anti-Proteasomenantikörper durch ELISA- und Immunoblotverfahren nachgewiesen haben (Arribas et al. 1991, Feist et al 1996, 1999, Mayo et al. 2002, Mayo et al, 2001, Storstein et al. 2005)

Dies ist auch eine für das diagnostische ANA-Screening wichtige Erkenntnis, da Anti-Proteasomenantikörper auf den in der ANA Diagnostik üblicherweise verwendeten HEP-2 Zellen Muster erzeugen, die den Mustern anderer spezifischer und teilweise

diagnostisch bedeutsamer Antikörper ähneln, wie z.B. denen von anti-ER Antikörpern, Jo-1 Antikörpern (Feist et al. 2003) oder antimitochondralen Antikörpern, die ein häufiger Befund bei primärer biliärer Zirrhose sind (Rekvig et al. 1979, Mathy et al. 1980). Für die Laborfachkräfte, die ANA Diagnostik mit der IIF betreiben, kann die Kenntnis der Muster, die von antiproteasomalen Antikörpern erzeugt werden, die Fehlerrate infolge falscher Interpretation von ANA-Mustern senken. Diese Verhältnisse spiegeln sich auch in den hier untersuchten Patientenseren wieder, die alle diskrete bis deutliche Merkmale von Anti-Proteasomenantikörpern offenbarten, teilweise jedoch Überlagerungseffekte durch andere ANAs zeigten.

Der Nachweis gereinigter Anti-Proteasomenantikörper ist somit eindeutig erfolgt. Für eine Charakterisierung humaner Anti-Proteasomenantikörper standen diese erstmals in Reinform zur Verfügung.

5.2. Anti-Proteasomenantikörper in der Immunfluoreszenz

5.2.1. Humane Anti-Proteasomenantikörper zeigten typische Verteilungsmuster für Proteasomen

Zur subzellulären Verteilung der Proteasomen finden sich in der Literatur unterschiedliche und teilweise widersprüchliche Angaben. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente unterstützen Arbeiten, in denen das Zytoplasma, der Nuclear Envelope, das Endoplasmatische Reticulum und der Nucleus Hauptlokalisationsort von Proteasomen in HEp-2-, HeLa- und SAOS2-Zellen sind (Rivett et al. 1992, Wilkinson et al. 1998). Die in der Doppelfärbung mit anti-MHC-I Antikörpern dargestellte Co-Lokalisation im Bereich des ER reflektiert, dass sich die Interaktion der Proteasomen mit den MHC-I Molekülen auf das Endoplasmatische Retikulum beschränkt, während auf der Zelloberfläche MHC-I Moleküle isoliert vorliegen.

Färbungen an HEK293-Zellen lieferten in einer anderen Arbeit jedoch keine Co-Lokalisation mit dem Chaperon des endoplasmatischen Retikulums BIP (Wigley et al. 1999).

Diese Befunde stehen mit den wichtigsten soweit bekannten Proteasomenfunktionen wie der Prozessierung von Transkriptionsfaktoren, dem Abbau von funktionslosen Proteinen sowie der Zellzykluskontrolle durch Spaltung von cyclinabhängigen Kinasen im Einklang (Seufert et al. 1992, Sawada et al. 1993, Rammensee 1993, Groettrup et al. 1996, Feist 1999, Rousset et al. 1996). Charakteristisch für das Proteasomenmuster auf HEP-2 Zellen war auch die Darstellung von Strukturen des Zytoskelettes. Assoziationen zum Zytoskelett sind ebenfalls in der Literatur beschrieben (Palmer et al. 1994, Hirsch et al. 2000, DeConto et al. 1979). Die nachgewiesene Filamentstruktur co-lokalisierte mit Antikörpern gegen die spezifischen Mitochondrienproteine HSP60 und M1. Da eine Assoziation von Proteasomen mit Mitochondrien nur unter besonderen Stoffwechselbedingungen beobachtet wurde, erscheint es wahrscheinlich, dass hier eine Interaktion mit einem Filament auftrat, das ebenfalls in Beziehung zu Mitochondrien steht (Palmer et al. 1996). Die Strukturen konnten auf Grund der Charakteristik des Musters mit den methodischen Einschränkungen der IIF bestimmt werden.

Bei allen untersuchten Antikörpern wurden durchgängig die Zellkerne angefärbt. Da ein fluoreszenznegativer Zellkern bei den verwendeten HEP-2 Zellen das Vorkommen von antiproteasomalen Antikörpern weitgehend ausschließt, ist auch zu diskutieren, ob Anti-Proteasomenantikörper Antinukleäre Antikörper (ANA) sind. Hinweise für eine Rolle der Proteasomen bei der Proteolyse von Kernproteinen im Nucleus wurden bereits durch die Entdeckung von Sequenzen für einen nukleären Transport (NLS) postuliert (Nederlof et al. 1995) und mit Bleichexperimenten in lebenden Zellen direkt nachgewiesen (Reits et al. 1997).

Die Befunde auf HeLa and SAOS2 Zellen zeigen, dass die Verteilung der Proteasomen vom Zelltyp, von der Phase im Zellzyklus und von den Wachstumsbedingungen abhängig sind. Hierbei konnten Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen bestätigt werden, die ebenfalls in Abhängigkeit von Ernährungszustand und Wachstumsdichte eine nukleäre oder zytoplasmatische Verteilung der Proteasomen beschrieben (Hong et al. 1994, Dahmann et al. 2000, Machiels et al. 1995). Diese Befunde decken sich mit Erkenntnissen, nach denen Proteasomen in proliferierenden Zellen zyklusregulierende Kernproteine wie cyclinabhängige Kinasen degradieren, während die im Zytosol stattfindende

Prozessierung von Antigenen zur Präsentation via MHC-I eine vorrangige Funktion von Proteasomen in der G0 Phase ist (Groettrup et al. 1996, Rivett et al. 1997, Rammensee et al. 1993). Für die zellzyklusabhängige Proteasomendarstellung wurde jedoch auch eine unterschiedliche Akzessibilität der Epitope unter verschiedenen Kulturbedingungen verantwortlich gemacht (Machiels et al. 1995). Besonderheiten einzelner Zellen konnten durch Doppelfärbungen bestätigt werden, obwohl die betreffenden Strukturen nicht eindeutig identifiziert werden konnten. Es scheint sich dabei um Präzipitate am ER zu handeln (Abb. 7) sowie Strukturen, die im Zusammenhang mit der Zelldegeneration und eventuell der Apoptose stehen. Unklar ist die Bedeutung der in Abb. 6C gezeigten nukleären Dots.

Die unterschiedlichen relativen Affinitäten einiger Referenzantikörper zu Proteasomen, die im Kern und im Zytoplasma lokalisiert sind (Abb.7A), lassen darauf schließen, dass die Antikörper mit Proteasomen unterschiedlicher antigener Eigenschaften reagieren. Möglicherweise handelt es sich um Proteasomen unterschiedlicher Zusammensetzung bezüglich ihrer Untereinheiten oder Regulatorproteine im Nukleus und im Zytoplasma. Derartige Assoziationen wurden bereits in der Literatur beschrieben (Joergsen et al. 1999, Nandi et al. 1997, Brooks et al. 2000). Diese Beobachtungen liefern einen weiteren Hinweis für die Existenz unterschiedlicher Proteasomenformen innerhalb einer Zelle. Ein anderer Erklärungsansatz für dieses Phänomen sind Unterschiede in den Penetrationseigenschaften unterschiedlicher Antikörpersuspensionen für die verschiedenen Zellkompartimente (s.a. Machiels et al. 1995). Diese Möglichkeit erscheint jedoch weniger wahrscheinlich, da die Antikörper unter annähernd gleichen Bedingungen bezüglich ihrer Konzentration und des verwendeten Lösungsmediums verwendet wurden.

Die erzielten Resultate lassen eine Zuordnung zu einer bestimmten Zellstruktur im Rahmen des Auflösungsvermögens eines optischen Mikroskops zu. Um Überlagerungsartefakte zu vermeiden, müssten weitere Untersuchungen mit Konfokal- oder Elektronenmikroskopie durchgeführt werden. Zur Beurteilung eines funktionellen Korrelates der beobachteten Befunde sind Untersuchungen an nicht fixierten oder lebenden Zellen notwendig.

Bei Vorliegen verschiedener ANA in hohen Titern ist die Beurteilung antiproteasomaler Antikörper durch die IIF unsicher, da die Muster der gereinigten humanen Anti-Proteasomenantikörper in den meisten Fällen deutlich von den Mustern ihrer jeweiligen Ausgangsseren abweichen (Abb.5). Überlagerungseffekte durch andere in den Seren vorkommende Auto-Antikörper spielen demzufolge eine wichtige Rolle, die bei der Beurteilung von Seren beachtet werden muss.

Sowohl die affinitätsgereinigten humanen Anti-Proteasomenantikörper als auch die Kontrollantikörper zeigten in ihren Mustern Strukturen, die als Lokalisationen von Proteasomen bereits identifiziert wurden. Im Detail spiegelte sich die komplexe Natur des Proteasomensystems in unterschiedlichen Färbungseigenschaften der verschiedenen Antikörper wieder, wodurch nochmals dargestellt wurde, dass es sich um ein dynamisches System handelt.

5.2.2. Referenzantikörper mit individuellen Färbecharakteristika- Hinweis auf unterschiedliche Proteasomenentitäten?

Die monoklonalen Antikörper HP810 und HP903 sowie die polyklonalen Antikörper K42, MP1 und MP3 wurden durch ELISA und Immunoblotverfahren charakterisiert (Egerer et al. 2002). Ein Beweis für die Spezifität der monoklonalen Antikörper für Proteasomen waren die Ergebnisse der alternierenden Doppelfärbungen der monoklonalen Antikörper HP810 und HP903 mit dem polyklonalen Antikörper MP3. Wurde der Antikörper MP3 zuerst inkubiert, war die Fluoreszenz der monoklonalen Antikörper reduziert. Umgekehrt hatte eine primäre Inkubation mit einem monoklonalen Antikörper keinen Einfluss auf die Fluoreszenz des polyklonalen Antikörpers. Hierbei zeigt sich, dass die polyklonalen Antikörper offenbar zum Teil kompetitiv Epitope besetzen, gegen welche die monoklonalen Antikörper reaktiv sind. Somit wurde die Bindung der monoklonalen Antikörper reduziert, wenn mit polyklonalen Antikörpern präinkubiert wurde. Umgekehrt besitzen die polyklonalen Antikörper viele verschiedene Bindungsspezifitäten, so dass sich die Blockierung eines einzigen Epitops durch die monoklonalen Antikörper nicht nachweislich auf die Intensität der Fluoreszenz auswirkte.

Da auch die Auswahl des Blockierungsmediums einen Einfluss auf die Intensität und die Ausprägung des Musters hatte, ist anzunehmen, dass die erzielten Muster in der Immunfluoreszenz immer auch die Färbebedingungen reflektieren. Dies bedeutet, dass Rückschlüsse auf die intrazelluläre Proteasomendistribution nicht uneingeschränkt möglich sind. Bestimmte Aspekte des Musters können auch präparative Ursachen haben. Eine detaillierte Analyse war mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht möglich. Die Auswirkungen dieses Umstandes auf die Verwertbarkeit der erbrachten Ergebnisse für das diagnostische Screening sind jedoch gering, solange die Färbungen nach denselben Standards durchgeführt werden, wie die diagnostischen Färbungen im ANA Screening. Hier steht die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse klar im Vordergrund. Rückschlüsse auf die Biochemie der untersuchten Antigene können nur im Zusammenhang mit weiteren Nachweismethoden erbracht werden. Da zu diagnostischen Zwecken humane Seren mit physiologischen Albuminkonzentrationen verwendet werden, entspricht das Modell mit Blockierung durch FKS am ehesten den Bedingungen der Routinediagnostik. Daher wurden für alle weiteren IIF Experimente die Zellen mit FKS blockiert. Es muss dabei allerdings beachtet werden, dass in der gängigen ANA Diagnostik bei hochtitrigen Seren auch das Serumalbumin stark verdünnt wird und dessen Blockierungseffekt damit entfällt und die Zellen de facto unblockiert gefärbt werden.

Unspezifische Färbungen durch Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper wurden durch Kontrollfärbungen ausgeschlossen.

5.3. In vitro wird die Proteasomenfunktion von Anti-Proteasomenantikörpern nicht beeinflusst

Da Proteasomen auch selbst aktiv an der Immunmodulation beteiligt sind (Groettrup et al. 1996, Rivett et al. 1997, Rammensee et al. 1993, Aki et al. 1994; Boes et al. 1994; Kuckelkorn et al. 1995; Nandi et al. 1996; Stohwasser et al. 1997), ist es vorstellbar, dass sie ursächlich an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beteiligt sind. Um eine mögliche Auswirkung von Anti-Proteasomenantikörpern auf ihr Zielantigen zu erfassen, wurden Untersuchungen im Protease Assay durchgeführt. Dabei sollte ausgeschlossen werden, dass es zu einer direkten

Inhibition der Proteasomenaktivität kommt. Unter der Annahme einer Penetration von lebenden Zellen durch Antikörper oder Wechselwirkungen mit zirkulierenden Proteasomen könnte dies zu einer gestörten Funktion der Proteasomen führen und somit auch Auswirkungen auf Entzündungsprozesse und Autoimmunmechanismen haben.

Da die meisten Anti-Proteasomenantikörper mit nichtkatalytischen α -Untereinheiten reagieren (Feist et al. 1996), wäre zu erwarten, dass die Beeinflussung aufgrund allosterischer Prozesse oder mechanischer Verlegung der Öffnungen des Proteasomenzylinders erfolgt. Die wesentlich selteneren Antikörper gegen katalytische Untereinheiten könnten aber durchaus im Stande sein, direkt mit der Proteasefunktion der Proteasomen zu interferieren.

Die Ergebnisse zeigten jedoch eindeutig, dass die Kinetik der Proteolyse weder durch Inkubation mit humanen Anti-Proteasomenantikörpern noch mit Referenzantikörpern beeinflusst wurde. Dies lässt vermuten, dass die proteolytische Funktion der Proteasomen nicht direkt durch Anti-Proteasomenantikörper verändert wird. Einschränkend muß beachtet werden, dass es sich bei diesem Experiment jedoch um einen quantitativen Nachweis handelte, der nur eine einzige proteolytische Funktion mit einem artifiziellen Substrat in einer unphysiologischen Umgebung zeigte. In weiterführenden Experimenten wurde eine indirekte Beeinträchtigung der Proteasomenfunktion durch Anti-Proteasomenantikörper bewiesen. Hierbei verhinderten Anti-Proteasomenantikörper die Proteasomenaktivierung durch den Proteasomenaktivator PA28. Dies führte zu signifikanter quantitativer Beeinträchtigung der Proteasomenfunktion *in vivo* (Brychcy et al. 2006).

Die proteasomale Proteindegradation und Bestückung der MHC-1-Moleküle ist ein intrazellulärer Prozess. Daher ist fraglich, ob eine Modifizierung intrazellulärer Proteasomen durch extrazellulär auftretende Anti-Proteasomenantikörper möglich ist. Wie eingangs jedoch dargestellt, wurden verschiedene Mechanismen der Inkorporation von Immunglobulinen in Zellen beschrieben (Alarcon-Segovia et al. 1978, Hormigo et al. 1996, Golan et al. 1997, Koscec et al. 1997, Deng et al. 2000). In diesen Arbeiten wurde die Frage diskutiert, inwieweit intrazelluläre Auto-Antikörper, insbesondere ANA an der Pathologie der Grunderkrankung beteiligt sind.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden derartige Zusammenhänge jedoch noch nicht ausreichend bewiesen. Von Oligopeptiden, die von extrazellulären Proteasomen produziert werden, ist durch deren rapide Zersetzung durch extrazelluläre Proteasen kein Einfluss auf die Immunmodulation durch Interaktion mit MHC-I Molekülen zu erwarten.

Anti-Proteasomenantikörper könnten aber eine Rolle beim Abbau von im Blut zirkulierenden Proteasomen spielen (Egerer et al. 2002, Dutaud et al. 2002). Diese Annahme wird von Ergebnissen unterstützt, nach denen zirkulierende Proteasomen auch in neoplastischen Erkrankungen nachgewiesen wurden, in denen keine Immundysregulation zu erwarten ist (Lavabre-Bertrand et al. 2001). Da zahlreiche im Blut stattfindende Prozesse wie die Blutgerinnung, die Komplementaktivierung und die Aktivierung von Entzündungskaskaden an die Funktion von Proteasomen gebunden sind, könnten freie Proteasomen diese Prozesse stören oder triggern. In diesem Zusammenhang wäre es ebenfalls vorstellbar, dass Anti-Proteasomenantikörper eine physiologische Antwort auf die möglicherweise schädigenden Einflüsse zirkulierender Proteasomen sind. Ob und in welcher Weise Anti-Proteasomenantikörper in die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen verwickelt sind oder ob es sich dabei lediglich um ein Epiphänomen im Verlauf der Autoimmunerkrankung handelt, kann derzeit noch nicht beurteilt werden.

5.4. Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Anti-Proteasomenantikörpern ist besonders unter differentialdiagnostischen Gesichtspunkten wichtig.

Für das ANA Screening spielen Anti-Proteasomenantikörper in mehreren Hinsichten eine Rolle. Zunächst kann eindeutig festgestellt werden, dass Anti-Proteasomenantikörper zu den anti-nukleären Antikörpern (ANA) gehören. In diesem Zusammenhang kann jedoch die Ähnlichkeit zu Komponenten von Mustern anderer Auto-Antikörper, wie z.B. solche gegen das endoplasmatische Retikulum oder Mitochondrien sowie Antikörper gegen Ro/La oder Jo1 Antigene zu diagnostischen Problemen führen. Dies trifft insbesondere zu, wenn Anti-Proteasomenantikörper zusammen mit anderen Auto-Antikörpern auftreten die ebenfalls eine zytoplasmatische Färbung verursachen. So wurden bei fünf Patienten (1, 3, 4, 6 und 7) aus dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektivs anti-

mitochondrale Antikörper aufgrund des ANA-Musters prognostiziert. Bei Patientin 6 wurden unter der Therapie insbesondere stark ansteigende Serumwerte für die Alkalische Phosphatase (AP) sowie die γ -Glutamyl-Transferase (γ -GT) bei mäßig erhöhten Transaminasen festgestellt. Im Zusammenhang mit einem zytoplasmatischen ANA-Muster lässt dies an eine Leberbeteiligung im Sinne einer primären biliären Zirrhose denken. Erst im Blot erwiesen sich alle Seren als AMA negativ, der Anstieg der Leberparameter bei Patientin 6 wurde auf eine toxische Wirkung der Cyclophosphamidtherapie zurückgeführt. Insbesondere ein toxischer Leberschaden und eine primär biliäre Zirrhose unterscheiden sich nur wenig in ihren Laborparametern. Anti-Mitochondrale Antikörper sind hierbei diagnostisch wegweisend. Wie hier gezeigt, sind Anti-Proteasomenantikörper jedoch ebenfalls häufige Befunde im Autoimmungeschehen und zeigen ähnliche ANA-Muster. In dieser Konstellation kann die Kenntnis der Rolle der Anti-Proteasomenantikörper Fehldiagnosen verhindern und die Antikörperdiagnostik effektivieren.

Eine weitere differenzialdiagnostische Option bei Nachweis eines Anti-Proteasomenmusters liefern Auto-Antikörper gegen die Untereinheiten des Proteasomenaktivators (PA28), die ebenfalls bei SLE und Sjögren Syndrom nachgewiesen wurden (Matsushita et al. 2004). Ob diese Antikörper auf HEp-2 Zellen (Bios[®]) ebenfalls relevante Muster wie Anti-Proteasomenantikörper produzieren, muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Eine eindeutige Differenzierung kann im Zweifelsfall mittels Immunoblot oder ELISA erfolgen.

5.5. Einfluss auf Anti-Proteasomenantikörper im Krankheitsverlauf

Erste Untersuchungen über Korrelationen von positiven Anti-Proteasomenantikörpertitern zum Krankheitsverlauf lassen auch eine Bedeutung von Anti-Proteasomenantikörpern als diagnostischen Marker erwarten (Kordonouri et al. 2004, Feist et al. 2003, Mayo et al. 2002, Storstein et al. 2005). Da bei dem hier untersuchten Patientengut keine Langzeittiter für Anti-Proteasomenantikörper existieren, sind Rückschlüsse auf eine Korrelation zum Krankheitsverlauf nur bedingt möglich. Auch in anderen Untersuchungen waren Anti-Proteasomenantikörpertiter im Krankheitsschub bzw. in einer Akutphase-Reaktion erhöht. In welchem Maß Anti-

Proteasomenantikörper dabei jedoch an der Symptomatik beteiligt sind oder ob sie nur Folge des Krankheitsgeschehens sind, lässt sich derzeit nicht sagen. Da jedoch bei Krankheitszuständen mit erhöhtem Zellumsatz auch Proteasomen als Autoantigen im verstärktem Maß freigesetzt werden (Egerer et al. 2002), kann dies möglicherweise die Ursache einer Induktion der Bildung von Anti-Proteasomenantikörpern sein, wobei durch die Antigenfreisetzung die Immuntoleranz durchbrochen werden könnte. Sekundär kann aus diesem Zustand eine Immunreaktion durch antikörpervermittelte Immunaktivierung verstärkt werden. Hinweise für eine antikörpervermittelte Dysregulation der Proteasomenfunktion selbst konnten im Protease Assay nicht erbracht werden. Eine Inhibition der Interaktion zwischen Proteasom und Proteasomenaktivator PA28 durch Anti-Proteasomenantikörper, wirkt sich jedoch quantitativ auf die Proteasomenfunktion aus (Brychcy et al. 2006). Diese Daten sprechen für die Möglichkeit, dass Anti-Proteasomenantikörper auch ursächlich am Krankheitsgeschehen beteiligt sein können oder in der Lage sind, den Krankheitsverlauf und die Symptomatik mit zu beeinflussen.

6. Zusammenfassung

Auto-Antikörper spielen für das Verständnis und die Diagnostik von Autoimmunerkrankungen eine Schlüsselrolle. Die vorliegenden Ergebnisse machen deutlich, dass Auto-Antikörper gegen das 20S-Proteasom einen relevanten diagnostischen Marker darstellen. Wichtige Eigenschaften dieser Antikörper wurden durch Affinitätsreinigung und anschließendem Einsatz insbesondere in der indirekten Immunfluoreszenz, dem wichtigsten Standardverfahren zur Auto-Antikörperdiagnostik, aufgedeckt.

Mit den beschriebenen Experimenten wurde ein weiterer unabhängiger Beweis zur Existenz von Anti-Proteasomenantikörpern erbracht. In Übereinstimmung zu Vorarbeiten kann davon ausgegangen werden, dass Anti-Proteasomenantikörper signifikant zu dem Pool von Auto-Antikörper bei den untersuchten Autoimmunerkrankungen beitragen.

Erstmals ist es gelungen, Anti-Proteasomenantikörper aus Patientenseren in reiner Form zu isolieren. Die Ergebnisse beweisen, dass Anti-

Proteasomenantikörper spezifisch gegen ihr natives Zielantigen reagieren. Es wurde gezeigt, dass sowohl die untersuchten humanen Auto-Antikörper als auch die verwendeten Referenzantikörper gegen 20S Proteasomen keinen direkten Einfluss auf die Proteasomenaktivität ausüben. Die Methodik der Affinitätsreinigung von Anti-Proteasomenantikörpern stellt die Grundlage für weiterführende biochemische und immunologische Untersuchungen dar.

In der indirekten Immunfluoreszenz wurden charakteristische und reproduzierbare Muster aufgedeckt, wobei sich die natürliche Verteilung von Proteasomen in Zytoplasma und Zellkern in einem komplexen Muster widerspiegelt. Durch eine exakte Charakterisierung des Immunfluoreszenzmusters von Anti-Proteasomenantikörpern wurde deutlich, dass es häufig zu Überlagerungseffekten mit etablierten ANA-Mustern kommt. In Folge dessen wird der Nachweis von Anti-Proteasomenantikörpern mittels konventioneller indirekter Immunfluoreszenz im Rahmen der Routinediagnostik deutlich erschwert und stellt hohe personelle Anforderungen. Dennoch ist durch die genaue Kenntnis dieser Eigenschaften ein immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Anti-Proteasomenantikörpern möglich. Eine Bestätigung des Verdachts auf Anti-Proteasomenantikörper in der IIF durch spezifische Immunoassays ist in Analogie zu den anderen bekannten Auto-Antikörpern sinnvoll.

Somit wird durch die hier gelieferten Erkenntnisse, die eine Detektion von Anti-Proteasomenantikörpern im Screeningverfahren der ANA-Diagnostik beschreiben, die Einbeziehung des hochinteressanten Autoimmunphänomens „Anti-Proteasomenantikörper“ in die diagnostische Routine ermöglicht. Hierdurch können in Zukunft effektiver weitere Daten zur Prävalenz, diagnostischen Wertigkeit und Bedeutung dieser Antikörper bei Autoimmunerkrankungen gewonnen werden.

Anhang 1:

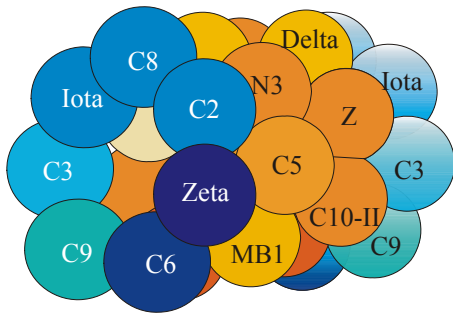


Abb.1: Das 20S Proteasom ist ein zylindrischer Komplex aus 28 Untereinheiten, die in vier Ringen gruppiert sind. Die katalytischen Untereinheiten befinden sich in den inneren Ringen (braun).

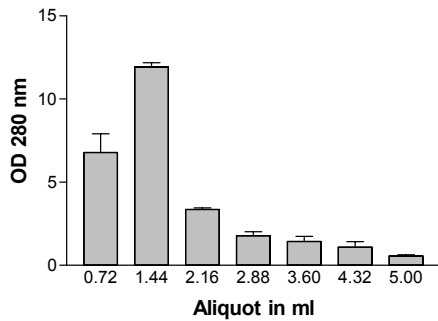


Abb. 2A: Isolierung der IgG aus den Patientenseren 1-7 an Protein G. Dargestellt ist die mittlere Absorptionen der Fraktionen der Eluate bei 280nm.

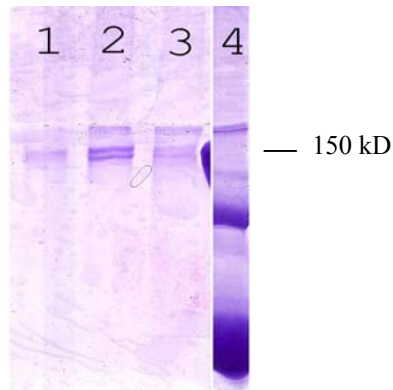


Abb. 2C: In der reduzierenden, nicht denaturierenden SDS-Elektrophorese stellt sich intaktes IgG in den Eluaten der Affinitätsreinigung dar. 1-3: Affinitätsgereinigte Antikörper der Patienten 5,1,4, Lane 4: Marker

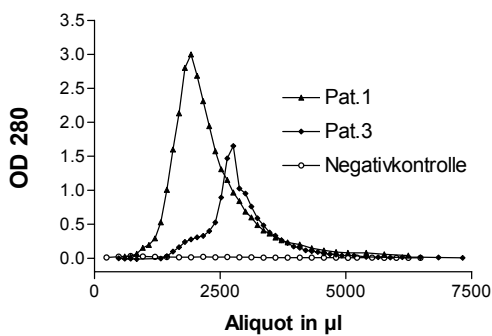
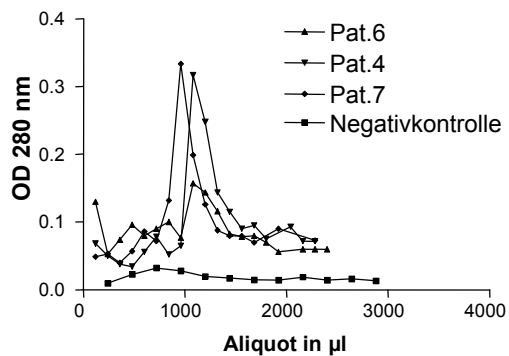
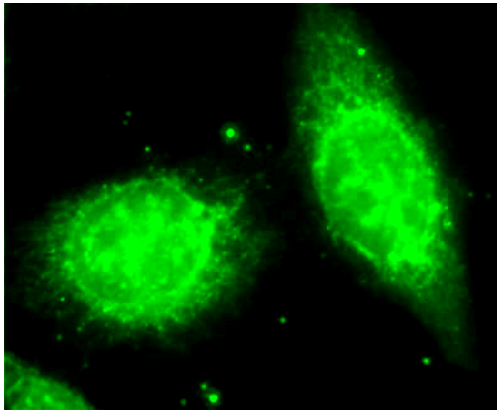
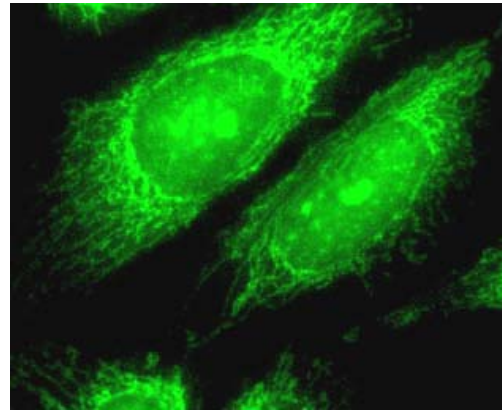


Abb. 2B: Affinitätsreinigung der humanen Ig-G-Antikörper an Proteasomen-Sephrose. Absorption der Eluate bei 280nm.

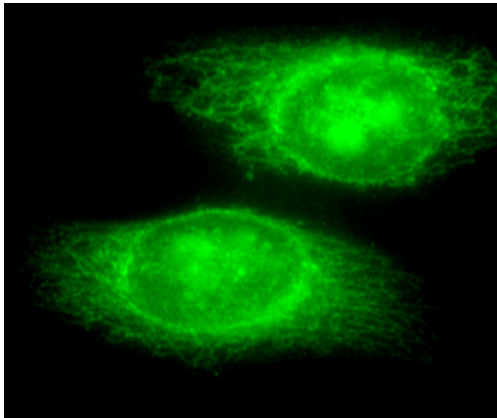




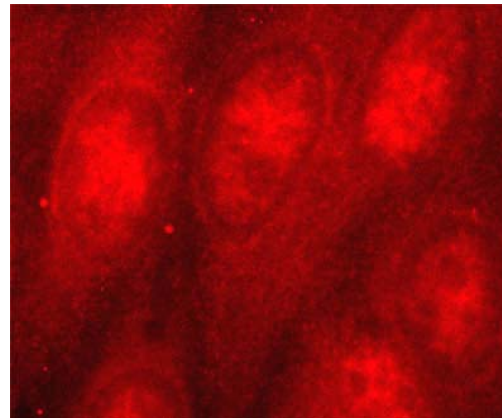
3A



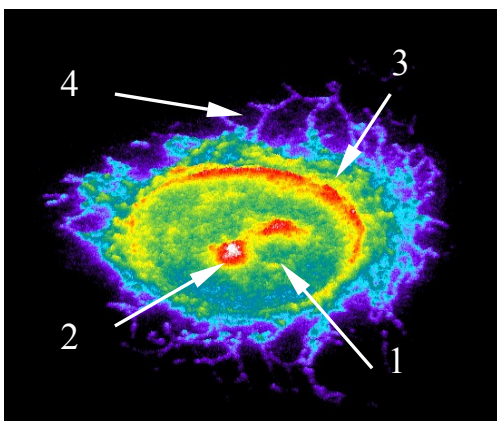
3B



3C



3D



3E

Abb.3: Vergleich verschiedener Anti-Proteasomenantikörper. **A:** humaner affinitätsgereinigter Anti-Proteasomen-antikörper, **B:** monoklonaler Mäus-antikörper gegen die Untereinheit C2, **C:** direkt FITC-markierter monoklonaler Mäusantikörper HP810, **D:** polyklonaler Kaninchenantikörper MP3. Die Bilder demonstrieren ein typisches Verteilungs-schema. Individuelle Charakteristika sind erkennbar. **E:** Intensitätsscan als

computerbearbeitetes Falschfarbenbild. Hier wird die Verteilung der Anti-Proteasomenantikörper besonders deutlich. Zu erkennen sind signalarme Nukleoli (1), eine erhöhte Antikörperkonzentrationen unmittelbar neben den Nukleoli (2), eine Anreicherung im Bereich des Nuclear Envelope (3) eine Anfärbung des Zytoplasmas, das in der Zellperipherie nur schwach erkennbar ist sowie zytoplasmatische Strukturen in der Zellperipherie (4).

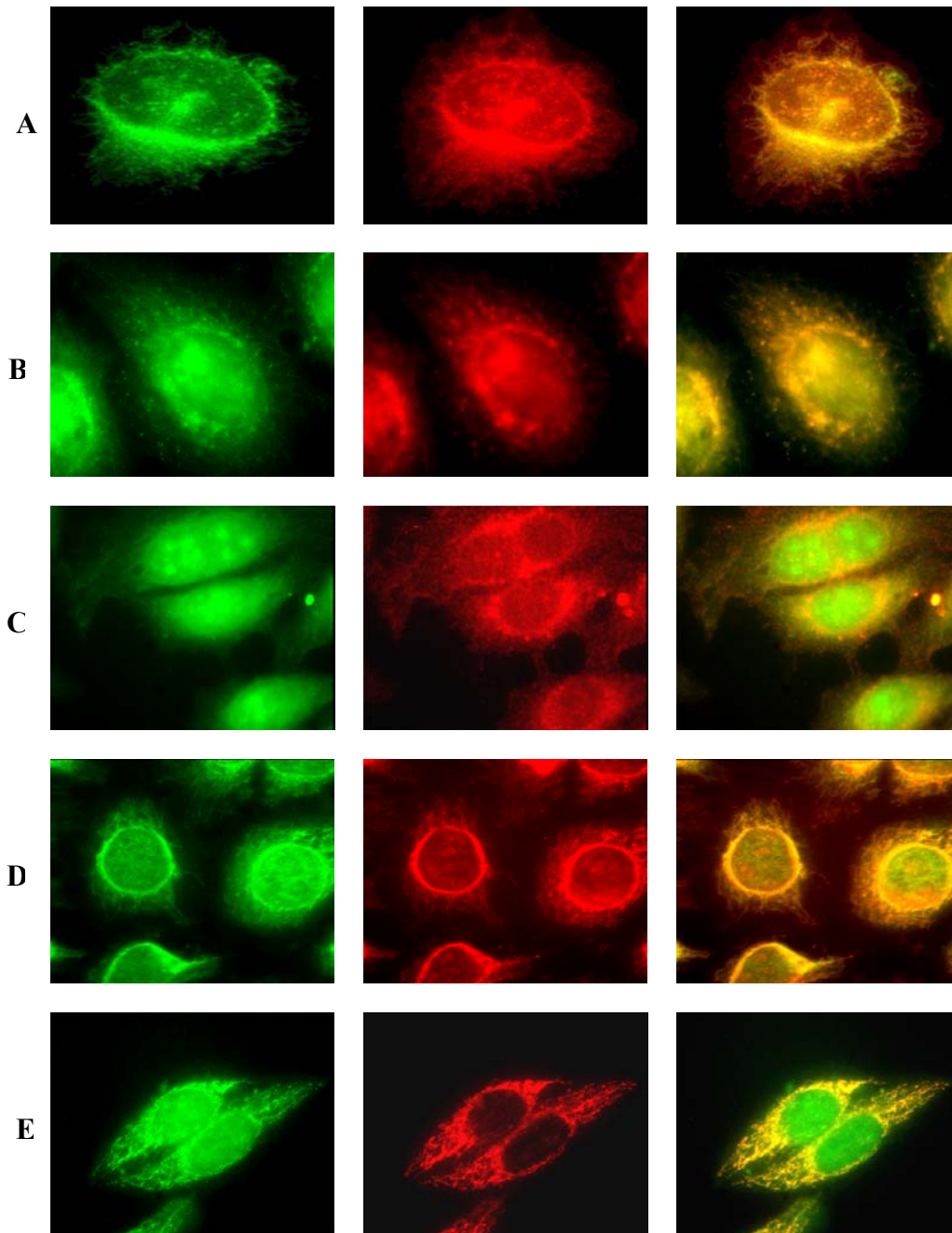


Abb.4: Doppelfärbungen. Spalte **I** zeigt Färbungen mit dem monoklonalen direkt FITC-markierten Antikörper HP810 (grün), Spalte **II** zeigt Geggefärbungen mit verschiedenen indirekt TRITC-Markierten Referenzantikörpern (rot), in Spalte **III** sind die überlagerten Bilder zu sehen. Reihe **A:** Doppelfärbung mit affinitätsgereinigtem humanem Anti-Proteasomenantikörper (Patient 1), Reihe **B:** Doppelfärbung mit Antikörpern gegen das ER-Markerprotein BIP, Reihe **C:** Doppelfärbung mit Antikörpern gegen MHC-I Moleküle, Reihe **D:** Doppelfärbung mit AMA-positivem humanem Serum, Reihe **E:** Doppelfärbung mit Antikörpern gegen das mitochondriale Markerprotein HSP70.

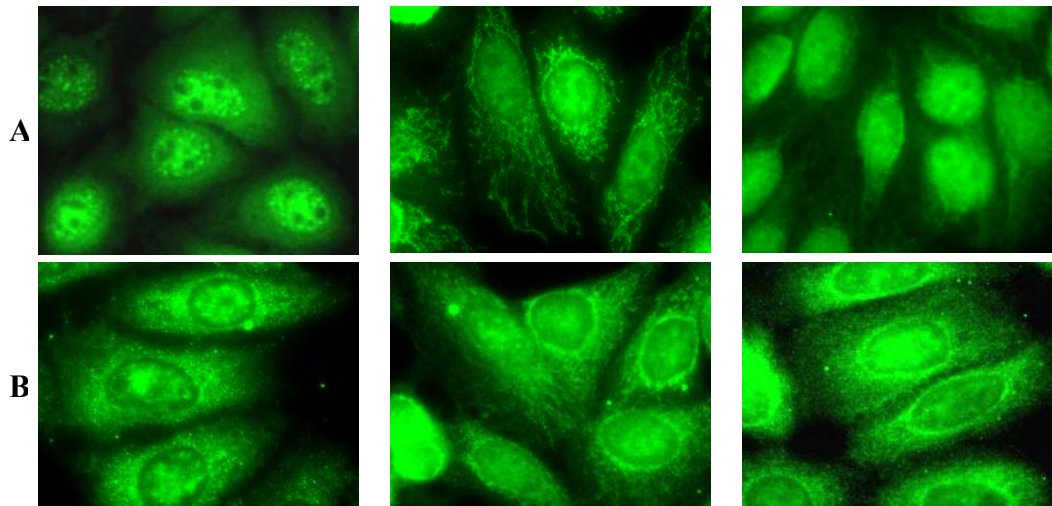


Abb.5 Patient 1

Abb.5 Patient 2

Abb.5 Patient 3

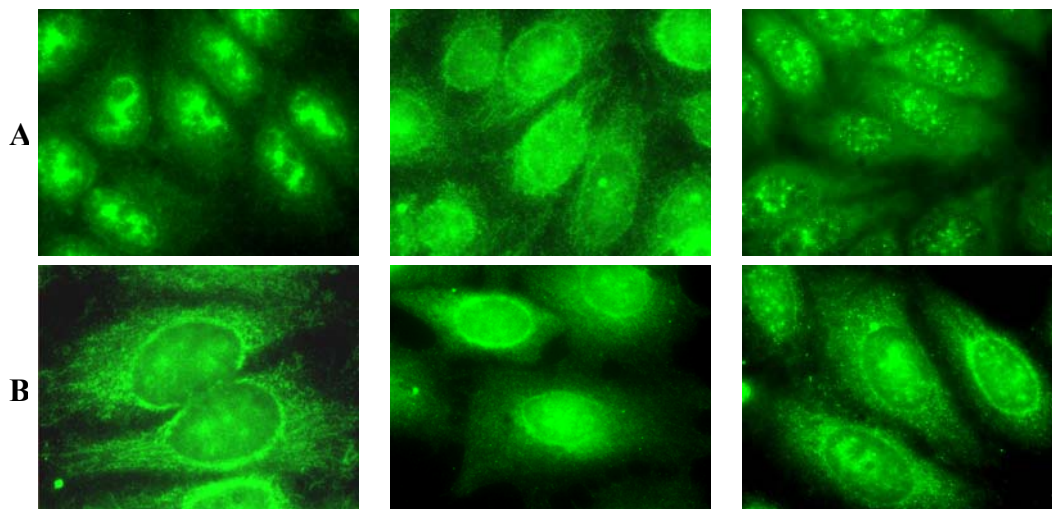


Abb.5 Patient 4

Abb.5 Patient 5

Abb.5 Patient 6

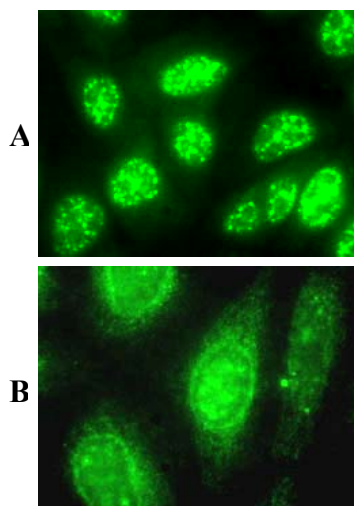


Abb.5 Patient 7

Abb.5: Vergleich der ANA-Bilder der kompletten Seren der untersuchten Patienten (**Reihe A**) und der korrespondierenden Färbungen der affinitätsgereinigten Antikörper (**Reihe B**). Das Proteasomenmuster ist in vielen Patientenserum erkennbar, in einigen Seren ist es jedoch durch andere ANA überlagert. In diesen Fällen wird das Anti-Proteasomenmuster erst durch die Affinitätsreinigung demaskiert. Die Zusammensetzung des Anti-Proteasomenmusters aus zytoplasmatischer und nukleärer Komponente erschwert die Diagnose zusätzlich.



Abb. 6A

Abb.6: HeLa- und SAOS-2 Zellen. A: Monoklonaler Anti-Proteasomenantikörper HP 810 (grün) und polyklonaler Anti-Proteasomenantikörper MP3 (rot) auf HeLa-Zellen einer Zellkultur mit geringer Konfluenz. Obwohl die Lokalisation in beiden Färbungen identisch ist, färbt der Antikörper HP810 das Zytoplasma stärker als der Antikörper MP3 bei gleicher Fluoreszenz des Kerns. Der Nucleus ist intensiver als das Zytoplasma gefärbt, die Nucleoli sind nicht angefärbt.

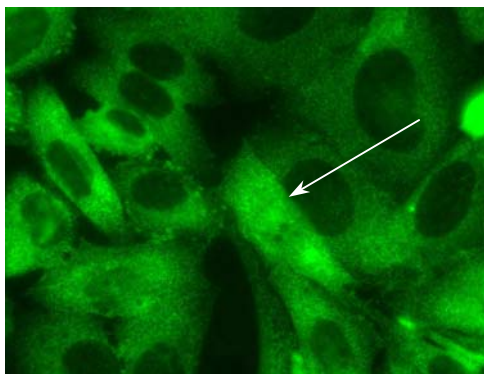


Abb. 6B

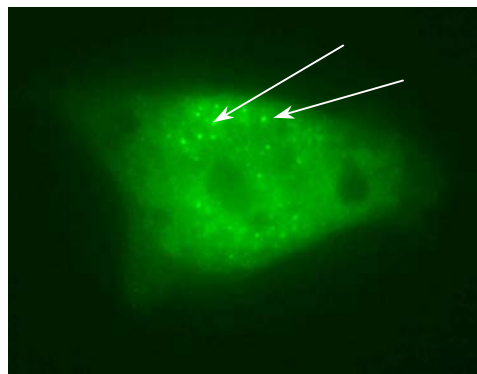


Abb. 6C

B: Anti-Proteasomenantikörper positives Serum (Pat.4) auf SAOS-2 Zellen. Die Kultur mit hoher Konfluenz zeigt Färbung im Zytoplasma, nicht jedoch in den Kernen. Eine einzelne Zelle (Pfeil) hat sich aus dem Zellverband herausgelöst und überwächst die darunterliegenden Zellen. Diese Zelle zeigt eine deutliche Färbung im Zellkern. **C:** Monoklonaler Anti-Proteasomenantikörper HP 810 auf HeLa-Zellen. Im Kern einiger Zellen erscheinen Dots innerhalb des Kerns (Pfeile).

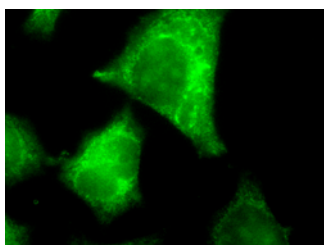
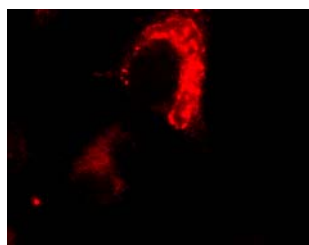
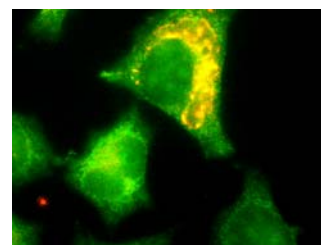


Abb. 7A

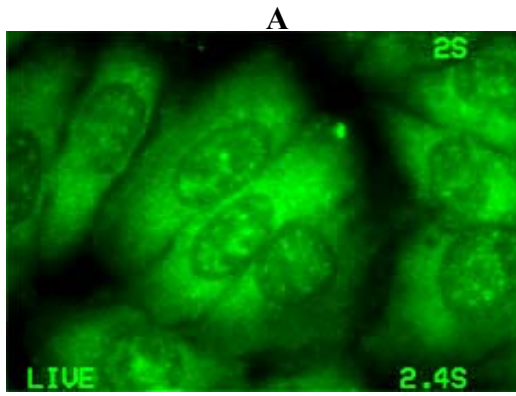


B

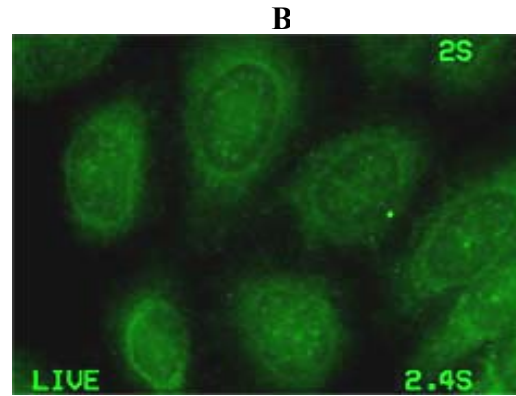


C

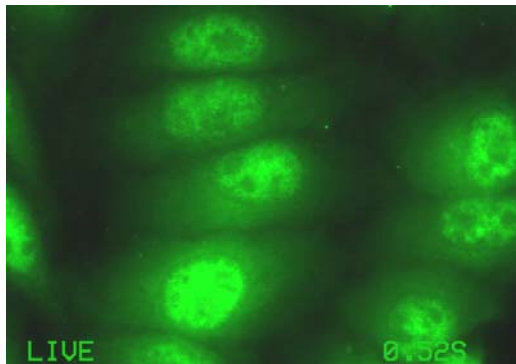
Abb.7: Monoklonaler Anti-Proteasomenantikörper HP 810 (A) und Monoklonaler Anti-Proteasomenantikörper C2 (B) auf HeLa Zellen. Durch den C2-Antikörper kommt es zur selektiven Färbung einer Struktur, die an das Muster des endoplasmatischen Retikulums erinnert. In diesem Bereich kommt es zu einer Co-Lokalisation beider Antikörper (C). Der Antikörper HP810 reagiert auch mit Proteasomenprecursoren.



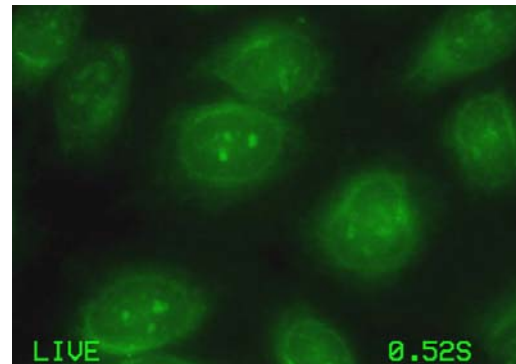
Patient 1



Patient 1 (+Proteasomen)



K42



K42 (+Proteasomen)

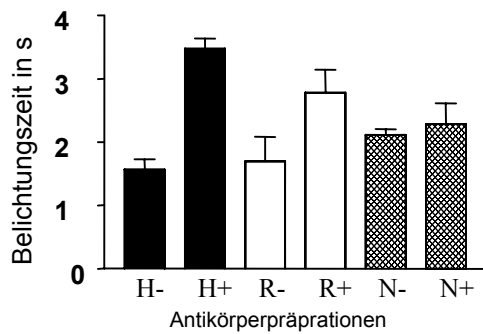


Abb.8B

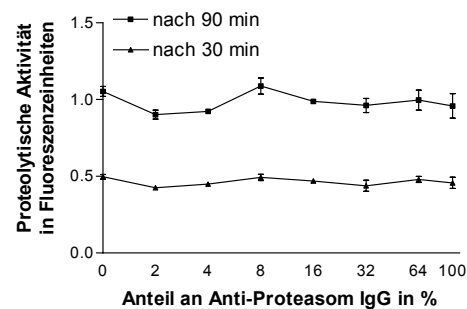


Abb. 9

Abb.8A: Konkurrenz von Anti-Proteasomenantikörpern mit 20S-Proteasomen. Korrespondierende Antikörper ohne und mit Proteasomen wurden jeweils mit gleicher Belichtungszeit aufgenommen. Sowohl die affinitätsgereinigten Anti-Proteasomenantikörper von Patient 1 als auch der Referenzantikörper K42 zeigen eine starke Reduktion der Fluoreszenz.

Abb.8B: Diagramm der Belichtungszeiten der untersuchten affinitätsgereinigten humanen Anti-Proteasomenantikörper (H), der Anti-Proteasomalen Referenzantikörper (R), und eines Anti-Proteasomenantikörpernegativen Kontrollserums (H) mit (+) und ohne (-) Konkurrenz durch Proteasomen.

Abb. 9: Inhibition der Proteasomenfunktion im MCA-Assay. Native 20S Proteasomen wurden mit humanen Anti-Proteasomenantikörpern in verschiedenen Anteilen vermischt. Gemessen wurde die proteolytische Aktivität der Proteasomen als MCA-Freisetzung nach 30 und nach 90 min.

Anhang 2: Formeln

Formel 1: Berechnung der Serumgammaglobulinkonzentration

$$C_{\gamma} = C_{ser} * p_{\gamma} [\%] / 100\%$$

Formel 2: Berechnung der in der Affinitätsreinigung verwendeten IgG-Menge aus der Absorption an Protein G

$$m_{IgG} = V_{aliquot} * \sum_{n=1}^5 (OD_{280nm \text{ IgG}})_n / 1,4$$

Formel 3: Berechnung der Menge an proteasomenspezifischen IgG (ausgeführt durch Graphpad Prism Stat Mate ®)

$$m_{affi} = \int_{V_{2C}}^{V_{1C}} f(x) dx - C_C (V_{2C} - V_{1C})$$

Formel 4: Berechnung des prozentualen Anteils proteasomenspezifischer IgG innerhalb der Gesamt-IgG.

$$p_{affi} [\%] = m_{affi} * 100\% / m_{IgG}$$

Formel 5: Berechnung der Konzentration proteasomenspezifischer IgG innerhalb der Gesamt-IgG.

$$C_{affi} = p_{affi} [\%] * C_{\gamma} / 100\%$$

Formel 6: Umrechnung der OD bei 280nm in Proteinkonzentration bezogen auf IgG

$$C_{IgG} = OD_{280nm} / 1,4$$

Formel 7: Berechnung der relativen Reduktion der Fluoreszenz von Anti-Proteasomenantikörpern nach Konkurrenz mit nativem Proteasom

$$P_{red} [\%] = 100\% - (100\% * t_{Bel}) / t_{Bel. komp}$$

C_{γ} : Konzentration der Gammaglobuline im Serum

C_{ser} : Serumproteinkonzentration, bestimmt nach Biuret

p_{γ} : Gammaglobulinfraktion, bestimmt mit Serumelektrophorese

m_{IgG} : Gesamtmasse des isolierten Protein = Gesamtmasse des isolierten IgG

$V_{aliquot}$: Volumen je Aliquot (=1ml)

$OD_{280nm \text{ IgG}}$: Extinktion der IgG-Eluate bei 280nm nach Absorption an Protein G

m_{affi} : Gesamtmasse des isolierten affinitätsgereinigten IgG

C_C : Cut-off-Konzentration (festgelegt bei 70 myg/ml)

V_{1C} : Cut-off-Volumen am Anfang der Eluation

V_{2C} : Cut-off-Volumen am Ende der Eluation

p_{affi} : Prozentualer Anteil antiproteasomaler Antikörper im Gesamtgammaglobulin

C_{affi} : Konzentration der Anti-Proteasomenantikörper im Serum

p_{red} : Reduktion der Fluoreszenz

t_{Bel} : durchschnittliche Belichtungszeit ohne Konkurrenz durch Proteasomen

$t_{Bel \text{ komp}}$: durchschnittliche Belichtungszeit mit Konkurrenz durch Proteasomen

Anhang 3 Glossar

ACR	American College of Rheumatology
AMA	Anti-Mitochondriale Antikörper
ANA	Anti-Nukleäre Antikörper
APA	Anti-Proteasomenantikörper
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol; blau fluoreszierende DNA interkallierende Substanz zur fluoreszenzmikroskopischen Lokalisierung von DNA
DM/PM	Dermatomyositis, Polymyositis
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid; Zusatzstoff zum Einfrieren lebender Zellen
dsDNA-Antikörper	ANA gegen Doppelstrang DNA, Assoziation mit SLE
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sobent Assay
ENA-Antikörper	Extractable Nuclear Antigen Antikörper = Antikörper, die gegen PBS-lösliche Kernproteine reaktiv sind. Diese sind durch einen Immunoblot leicht nachweisbar und dienen der weiteren Spezifizierung der ANA
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat, grün fluoreszierender Farbmaler
IFN- γ	Interferon Gamma, Zytokin zur Vermittlung der Immunabwehr
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
Jo-1-Antikörper	ANA gegen die Histidyl-tRNA Synthetase, Assoziation mit DM/PM
La-Antikörper	ANA gegen RNA-Polymerase III, Assoziation mit pSS
MCA	7-Amino-methyl-Coumarin
MCTD	Mixed Connective Tissue Disease = Mischkollagenose
NP40	Nichtionisches Detergenz
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
Ro-Antikörper	ANA gegen Y1-Y5 RNA assoziierte Proteine, Assoziation mit pSS
RPMI-Medium	Nährmedium zur Zellzucht
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes, eine Autoimmunerkrankung
Sm-Antikörper	ANA gegen nukleären Splicosomenkomplex (Sm-snRNP), Assoziation mit Nierenbeteiligung bei SLE
TRIS	1,1,1-Tris(hydroxymethyl)-methylamin, basische Puffersubstanz
TRITC	Tetramethyl-Rhodaminisothiocyanat, rot fluoreszierender Farbmaler
TWEEN	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat. Detergenz.
U1RNP-Antikörper	ANA gegen das Ribonukleoprotein U1, Assoziation mit MCTD

Literatur

1. Ahn JY, Tanahashi N, Akiyama K, Hisamatsu H, Noda C, Tanaka K, Chung CH, Shibmura N, Willy PJ, Mott JD (1995). Primary structures of two homologous subunits of PA28, a gamma-interferon-inducible protein activator of the 20S proteasome. *FEBS Lett* 366:37
2. Adler GK, Geenen R.: Hypothalamic-pituitary-adrenal and autonomic nervous system functioning in fibromyalgia. *Rheum Dis Clin North Am.* 2005 Feb;31(1):187-202, xi
3. Aki M, Shimbara N, Takashina M, Akiyama K, Kagawa S, Tamura T, Tanahashi N, Yoshimura T, Tanaka K, Ichihara A (1994). Interferon- (induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem* 115:257-269
4. Alarcon-Segovia, D., Ruiz-Arguelles, A. and Fishbein, E. 1978. Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors. *Nature* 271:67
5. Alexander EL, et al. Ro(SSA) and La(SSB) antibodies in the clinical spectrum of Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 1982; 9:239-246
6. Arbuckle MR, Mc Clain MT, Rubertone MV et al. (2003) Development of Autoantibodies before the clinical onset of Systemic Lupus Erythematosus *N Engl J Med* 349, 1526-1533
7. Arribas J, Rodriguez ML, Do Forno RA, Castano JG (1991). Autoantibodies against the multicatalytic proteinase in patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 173:423
8. Banerjee D, Liefshitz A. Sloan Kettering Potential of the proteasomal inhibitor MG-132 as an anticancer agent, alone and in combination, *Anticancer Res* 2001 Nov-Dec;21(6A):3941-7
9. Baracos-VE; DeVivo-C; Hoyle-DH; Goldberg-AL (1995): Activation of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle of cachectic rats bearing a hepatoma. *Am-J-Physiol.* 268(5): E996-1006
10. Barnett.E.V. (1966) Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens. *California Medecine* 104:463-469
11. Bernstein RM: Autoantibodies in myositis; *Baillieres Clin Neurol.* 1993 Nov;2(3):599-615
12. Boes B, Hengel H, Ruppert T, Multhaupt G, Koszinowski UH, Kloetzel PM (1994). Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J Exp Med* 179(3): 901-9
13. Bohan A, and Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:344-7
14. Bohan A, and Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:403-7
15. Brooks P, Fuertes G, Murray RZ, Bose S, Knecht E, Rechsteiner MC, Hendil KB, Tanaka K, Dyson J, Rivett J. Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells *Biochem J.* 2000 Feb 15;346 Pt 1:155-61
16. Brooks P, Murray,R.Z., Mason,G.G.; Hendil, K.B., Rivett, A.J., Association of immunoproteasoms with the endoplasmatic reticulum, *Biochem.J.* 2000 352 Pt.3:611-615
17. Brychcy M, Kuckelkorn U., Hausdorf G., Egerer K, Kloetzel P.M., Burmester G.R Feist E.: Anti-20S Proteasome Autoantibodies Inhibit the Proteasome Stimulation by Proteasome Activator (PA28). *Arthritis and Rheumatism*, 2006 Jun

- 26;54(7):2175-2183
18. Buyon JP, Ben-Chetrit E, Karp S, Roubey RA, Pompeo L, Reeves WH, Tan EM, Winchester R (1989): Acquired congenital heart block. Pattern of maternal antibody response to biochemically defined antigens of the SSA/Ro-SSB/La system in neonatal lupus. *J.Clin.Invest.*84(2):627-634
 19. Casalo SP, et al. Significance of antibodies to DNA in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1964; 7:379-390
 20. Casals, SP, Friou, G.J., Myers,L.L.(1964) Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus, *Arthritis Rheum.* 7, 379-390
 21. Chen M, von Mikecz A. Proteasomal processing of nuclear autoantigens in systemic autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2005 Mar;4(3):117-22.
 22. Colglazier CL, Sutej PG. Laboratory testing in the rheumatic diseases: a practical review. *South Med J.* 2005 Feb;98(2):185-91.
 23. Colombo E., Banki K., Tatum A.H., Daucher J, Ferrante P, Murray RS et al. Comparative analysis of antibody and cell mediated autoimmunity to transaldolase and myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. *J.Clin Invest* 1997; 99: 1238-50
 24. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL (1996). Structure and function of the 20S and 26S proteasomes. *Ann Rev Biochem* 65:801-847
 25. Crofford LJ: Neuroendocrine Aspects of Fibromyalgia. *J Musculoskelet Pain* 1994; 2: 125-133
 26. Cuervo AM, Palmer A, Rivett AJ, Knecht E. *Eur J Biochem.* Degradation of proteasomes by lysosomes in rat liver 1995 Feb 1;227(3):792-800
 27. Dahlmann B, Ruppert T, Kuehn L, Merforth S, Kloetzel PM. Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. *J Mol Biol.* 2000;303(5):643-53
 28. DeConto F, Missorini S, Arcangeletti C, Pinardi F, Montarras D, Pinset C, Vassy J, Géraud G, Chezzi C, Scherrer K: Prosome Cytodistribution Relative to Desmin and Actin Filaments in Dividing C2.7 Myoblasts and during Myotube Formation in Vitro, 1979, *Exp.Cell Res.* 233, 99-117
 29. Deng SX, Hanson E, Sanz I. In vivo cell penetration and intracellular transport of anti-Sm and anti-La autoantibodies *Int Immunol.* 2000 Apr;12(4):415-23.
 30. DeVries GH. Cryptic axonal antigens and axonal loss in multiple sclerosis. *Neurochem Res.* 2004 Nov;29(11):1999-2006
 31. Dörner T, Chaoui R, Feist E, Göldner B, Yamamoto K, Hiepe F (1995): Significantly increased maternal and fetal IgG autoantibody levels to 52kD Ro(SS-A) and La(SS-B) in complete congenital heart block. (*J.Autoimmunity* 8:675-684
 32. Dutaud D, Aubry L, Henry L et al. Development and evaluation of sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma. *J. Immunol Methods* 2002;260: 183-93
 33. Egerer K, Kuckelkorn U, Rudolph PE, Ruckert JC, Dorner T, Burmester GR, Kloetzel PM, Feist E.: *J Rheumatol* 2002 Oct;29(10):2045-52 Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases
 34. Elliott PJ, Zollner TM, Boehncke WH. Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy *J Mol Med.* 2003 Apr;81(4):235-45
 35. Esposito M, Venkatesh V, Otvos L, Wenig Z., Vajda S, Banki K et al. Human Transaldolase and cross reactive viral epitopes identified by autoantibodies of multiple sclerosis patients. *J. Immunol.* 1999; 163: 4027-32
 36. Feist E, Dörner T, Kuckelkorn U, Scheffler S, Burmester G, Kloetzel P. Diagnostic

- importance of anti-proteasome antibodies. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123:92-97.
37. Feist E, Dörner T, Kuckelkorn U, Schmidtke G, Micheel B, Hiepe F, Burmester GR, Kloetzel PM. The proteasome (γ -type subunit C9 is a primary target of autoantibodies in sera of patients with myositis and systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1996;184:1313-1318
 38. Feist E, Kuckelkorn U, Dörner T, Dönitz H, Scheffler S, Hiepe F, Burmester GR, Kloetzel PM. Autoantibodies in primary Sjögren's Syndrome are directed against proteasomal subunits of the alpha and beta type. *Arthritis Rheum* 1999;42:697-702
 39. Feist, M-L Schneider, M Brychcy, T Dorner, G-R Burmester, and F Hiepe: A unique autoantibody pattern of positive anti-Jo-1, anti-U1RNP, and antiproteasome antibodies in autoimmune myositis as a diagnostic challenge *Ann. Rheum. Dis*, April 1, 2003; 62(4): 370 - 371.
 40. Fernandez-Madrid F, Mattioli M.: Antinuclear antibodies (ANA): immunologic and clinical significance. *Semin Arthritis Rheum*. 1976 Nov;6(2):83-124.
 41. Golan, T. D. 1997. The nuclear compartment of living cells is not an absolute immunologically sequestered site: evidence for spontaneous intranuclear entry of lupus autoantibodies to living cells
 42. Griep EN, Boersma JW, de Kloet ER: Altered reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the primary fibromyalgia syndrome. *J Rheumatol* 1993 Mar; 20(3): 469-74
 43. Groettrup-M; Soza-A; Kuckelkorn-U; Kloetzel-PM (1996): Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. *Immunol-Today*. 17(9): 429-35
 44. Groll-M.,Ditzel-L.; Löwe-J.; Stock-D.; Bochtler-M.;Bartunik-H.D.; Huber-R. (1997): Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386 (3):463-471
 45. Hirsch C, Ploegh, HL, Intracellular targeting of the proteasome, *Trends Cell Biol*. 2000, 7: 268-272
 46. Hong, SO, Ahn, JY, Lee, CS, Kang,MS, Ha, DB, Tanaka,K., Chung,CH, Tissue-specific expression of the subunits of chick 20S proteasomes. *Biochem Mol Biol.Int*. 1994,4:723-729
 47. Hormigo, A., Ball, C. and Lieberman, F. 1996. Internalization of anti-Hu IgG is not Fc gamma receptor mediated. *Neurology* 47:607
 48. Isozaki-U; Mitch-WE; England-BK; Price-SR (1996): Protein degradation and increased mRNAs encoding proteins of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in BC3H1 myocytes require an interaction between glucocorticoids and acidification.*Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A*. 93(5): 1967-71
 49. Joergsen,L., Hendil,KB., Proteasome Subunit Zeta, a putative ribonuclease, is also found as a free monomer, *Mol.Biol.Rep*.1999,3,215-216
 50. Kawakami A, Nakashima T, Sakai H, Hida A, Urayama S, Yamasaki S, Nakamura H, Ida H, Ichinose Y, Aoyagi T, Furuichi I, Nakashima M, Migita K, Kawabe Y, Eguchi K.: Regulation of synovial cell apoptosis by proteasome inhibitor, *Arthritis Rheum*. 1999 Nov;42(11):2440-8
 51. Kloetzel PM, Ossendorp F. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol*. 2004 Feb;16(1):76-81.
 52. Kopp-F; Hendil-KB; Dahlmann-B; Kirstensen-P; Sobek-A;Uerkvitz-W (1997): Subunit arrangement in the human 20S proteasome. *Proc-Natl_Acad_Sci- USA* 94:2939-2944

53. Kordonouri O, Meyer K, Egerer K, Hartmann R, Scheffler S, Burmester GR, Kuckelkorn U, Danne T, Feist E. Prevalence of 20S proteasome, anti-nuclear and thyroid antibodies in young patients at onset of type 1 diabetes mellitus and the risk of autoimmune thyroiditis. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2004 Jul;17(7):975-81.
54. Koscec, M., Koren, E., Wolfson-Reichlin, M., Fugate, R. D., Trieu, E., Targoff, I. N. and Reichlin, M. 1997. Autoantibodies to ribosomal P proteins penetrate into live hepatocytes and cause cellular dysfunction in culture. *J. Immunol.* 159:2033
55. Kuckelkorn U, Ruppert T, Strehl B, Jungblut PR, Zimny-Arndt U, Lamer S, Prinz I, Drung I, Kloetzel PM, Kaufmann SH, Steinhoff U. Link between organ-specific antigen processing by 20S proteasomes and CD8(+) T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med.* 2002 Apr 15;195(8):983-90
56. Kuckelkorn-U; Frentzel-S; Kraft-R; Kostka-S; Groettrup-M; Kloetzel-PM (1995): Incorporation of major histocompatibility complex--encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma. *Eur-J-Immunol.* 25 (9): 2605-11
57. Lavabre-Bertrand T, Henry L, Carillo S, et al. Plasma proteasome level is a potential marker in patients with solid tumors and hemopoetic malignancies. *Cancer* 2001; 92:2493-500
58. Levine SM, Rosen A, Casciola-Rosen LA. :Anti-aminoacyl tRNA synthetase immune responses: insights into the pathogenesis of the idiopathic inflammatory myopathies *Curr Opin Rheumatol.* 2003 Nov;15(6):708-13
59. Levo Y, et al. Significance of anti-ENA, Sm and RNP and antibodies in patients with anti-nuclear antibodies. *Isr J Med Science* 1982; 18:287-289
60. Machiels BM, Henfling ME, Broers JL, Hendil KB, Ramekers FC (1995) Changes in immunocytochemical detectability of proteasome epitopes depending on cell growth and fixation conditions of lung cancer cell lines. *Eur J Cell Biol* 66:282-292
61. Mathy, J.P., Baum, R., Toh, B.H. (1980), Autoantibodies to Ribosomes and Systemic Lupus Erythematosus, *Clin. Exp. Immunol.* 41, 73-80
62. Matsushita M, Takasaki Y, Takeuchi K, Yamada H, Matsudaira R, Hashimoto H. Autoimmune response to proteasome activator 28alpha in patients with connective tissue diseases; *J Rheumatol.* 2004 Feb;31(2):252-9
63. Matthews MB, Bernstein RM (1983): Myositis Autoantibody inhibits histidyl-tRNA synthetase: a model for autoimmunity. *Nature* 304:177-179
64. Mayo I, Arizti P, Pares A, Oliva J, DoForno RA, de Sagarra MR, Rodes J, Castano JG.: Antibodies against the COOH-terminal region of E. coli ClpP protease in patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 2001 May;34(5):785-7
65. Mayo I, Arribas J, Villoslada P, Alvarez DoForno R, Rodriguez-Vilarino S, Montalban X, Sagarra MR, Castano JG (2002): The Proteasome is a major autoantigen in multiple sclerosis. *Brain* 125, 2658-67
66. Mengual, E., Arizti, P., Rodrigo, J., Manuel Giménez-Amaya J., Castaño J.G. :Immunohistochemical Distribution and Electron Microscopic Subcellular Localization of the Proteasome in the Rat CNS, *J.O Neuroscienc*, Vol.16, Number 20, 1996 pp. 6331-6341
67. Nandi D, Jiang H, Monaco JJ (1996). Identification of MECL-1 (LMP10) as the third IFN-(inducible proteasome subunit. *J Immunol* 156:2361-2364
68. Nandi, D, Woodward, E., Ginsburg, D.B., Monaco, J.J. Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implicatons for the assembly of precursor beta subunits. *EMBO J*, 1997: 16, 5363-5375
69. Nederlof PM, Wang HR, Baumeister W (1995). Nuclear localization signals of human and *Thermoplasma* proteasomal (subunits are functional in vitro. *Proc*

- Natl Acad Sci USA 92:12060-12064)
70. Noda, C., Tanahashi, N., Shimbara, N., Hendil, K.B., Tanaka, K.: Tissue Distribution of constitutive proteasomes, immunoproteasomes and PA28 in rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000;277(2):348-354
 71. Noelle RJ, Erickson LD. Determinations of B cell fate in immunity and autoimmunity *Curr Dir Autoimmun.* 2005;8:1-24.
 72. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple Sclerosis . Review. *New England J Med* 2000; 343: 983-52
 73. Noseworthy JH. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis, Review, *Nature* 1999; 299 (6738 Suppl): A40-7, Noseworthy et al. 2000
 74. O'Farrell PZ, Goodman HM, O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 1977; 12:1133.
 75. Ohmori H, Kanayama N. Mechanisms leading to autoantibody production: link between inflammation and autoimmunity *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2003 Sep;2(3):232-41
 76. Ondrey F. G., Dong G., Sunwoo J., Chen Z., Wolf J. S., Crowl-Bancroft C. V., Mukaida N., Van Waes C. Constitutive activation of transcription factors NF-(κ B), AP-1, and NF-IL6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines. *Mol. Carcinog.*, 26: 119-129, 1999.
 77. Palmer A, Mason GG, Paramio JM, Knecht E, Rivett AJ.: Changes in proteasome localization during the cell cycle. *Eur J Cell Biol.* 1994 Jun;64(1):163-75
 78. Palmer A, Rivett AJ, Thomson S, Hendil KB, Butcher GW, Fuertes G, Knecht E: Subpopulations of Proteasomes in Rat Liver Nuclei, Microsomes and Cytosol; *Biochem.J.* 1996, 316, 401-407
 79. Palombella VJ, Conner EM, Fuseler JW, Destree A, Davis JM, Laroux FS, Wolf RE, Huang J, Brand S, Elliott PJ, Lazarus D, McCormack T, Parent L, Stein R, Adams J, Grisham MB (1998). Role of the proteasome and NF- κ B in streptococcal cell wall-induced polyarthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15671-15676
 80. Plotz PH, Targoff I. Myositis associated antigens. Aminoacyl-tRNA synthetases. In : *Manual of Biological Markers of Disease.* Eds, WJ Van venrooij and R Maini. Kluwer Academic Publications. The Netherlands. pp B6.1: 1-18; 1994
 81. Porcile C, Piccioli P, Stanzione S, Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Florio T, Schettinia G: Proteasome Inhibitors Induce Cerebellar Granule Cell Death: Inhibition of Nuclear Factor- κ B Activation *Ann N Y Acad Sci* 2002 Nov;973:402-413
 82. Putterman C. New approaches to the renal pathogenicity of anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2004 Feb;3(2):7-11.
 83. Qureshi N, Vogel SN, Van Way C, Papasian CJ, Qureshi AA, Morrison DC. The proteasome: a central regulator of inflammation and macrophage function. *Immunol Res.* 2005;31(3):243-60.
 84. Rammensee HG, Falk K, Rötzschke O (1993). Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* 11, 213- 244
 85. Rechsteiner-M; Hoffman-L; Dubiel-W (1993): The multicatalytic and 26 S proteases. *J Biol.Chem.*, 268(9), 6065- 68
 86. Reits, E., A.M. Benham, B. Plougastel, J. Neefjes, J. Trowsdale, Dynamics of proteasome distribution in living cells, *EMBO Vol.16 Nr.20* pp 6087-6094, 1997
 87. Rekvig, O.P. Hannestad, K. (1979) The Specificity of Human Autoantibodies that react with both, Cell Nuclei and Plasma Membranes: The nuclear Antigen is

- present on Core Mononucleosomes. *J. Immunol.* 132,2673-2681
88. Rivett A J, Mason GG, Murray RZ, Reidlinger J (1997). Regulation of proteasome structure and function. *Mol Biol Rep* 24:99-102
 89. Rivett, A.J., A. Palmer, E. Knecht, Electron microscopic Localisation of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and cultured cells, *J. Histochemistry and Cytochemistry* 1992, Vol.40, issue 8, pp.1165-1172
 90. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 1994 Sep 9;78(5):761-71
 91. Roth GA, Moser B, Krenn C, Roth-Walter F, Hetz H, Richter S, Brunner M, Jensen-Jarolim E, Wolner E, Hoetzenecker K, Boltz-Nitulescu G, Ankersmit HJ. Heightened levels of circulating 20S proteasome in critically ill patients. *Eur J Clin Invest.* 2005 Jun;35(6):399-403.
 92. Rousset R, Desbois C, Bantignies F, Jalinot P (1996). Effects on NF-kappa B1/p105 processing of the interaction between the HTLV-1 transactivator Tax and the proteasome. *Nature* 381(6580): 328-31
 93. Russell IJ, Orr MD, Littman B: Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. *Arthritis Rheum* 1994 Nov; 37(11): 1593-601
 94. Russell IJ: Biochemical Abnormalities in Fibromyalgia Syndrome. *J Musculoskelet Pain* 1994; 2: 101-115
 95. Sawada H, Muto K, Fujimuro M, Akaishi T, Sawada MT, Yokosawa H, Goldberg A (1993). Different ratios in 20 S proteasomes and regulatory subunit complexes in two isoforms of the 26 S proteasome purified from rabbit skeletal muscle. *FEBS-Lett* 335(2): 207-12
 96. Seemüller E, Lupas A, Stock D, Löwe J, Huber R and Baumeister W (1995). Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* 268:579-582
 97. Seufert W, Jentsch S (1992). In vivo function of the proteasome in the ubiquitin pathway. *EMBO-J* 11(8): 3077-80
 98. Sharp GC, Irvin WS, Gould RG, Holman HR, Tan EM., 1972: an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA), *Am.J.Med.*52:148-159
 99. Sharp GC, WS Irvin, CM May, HR Holman, FC McDuffie, EV Hess, and FR Schmid, 1979: Association of antibodies to ribonucleoprotein and Sm antigens with mixed connective-tissue disease, systematic lupus erythematosus and other rheumatic diseases, *N.Engl.J.Med.*295:1149-1145
 100. Sharp GC. Anti-nRNP and anti-Sm antibodies. *Arth Rheum* 1982; 25:757-760
 101. Snapper CM, P Zelazowski, FR Rosas, MR Kehry, M Tian, D Baltimore and WC Sha: B cells from p50/NF-kappa B knockout mice have selective defects in proliferation, differentiation, germ-line CH transcription, and Ig class switching *The Journal of Immunology*, 1996, Vol 156, Issue 1 183-191
 102. Stoeber PE, Lavabre-Bertrand T, Henry L, Guiraud I, Carillo S, Dandurand M, Joujoux JM, Bureau JP, Meunier L. High plasma proteasome levels are detected in patients with metastatic malignant melanoma. *Br J Dermatol.* 2005 May;152(5):948-53.
 103. Stohwasser-R; Standera-S; Peters-I, Kloetzel- PM; Groettrup- M (1997): Molecular cloning of the mouse proteasome subunits MC14 and MECL-1: reciprocally regulated tissue expression of interferon-g- modulated proteasome

- subunit. *Eur.J.Immunol.* 27: 1182- 1187
104. Storstein A, Knudsen A, Vedeler CA. Proteasome antibodies in paraneoplastic cerebellar degeneration. *J Neuroimmunol.* 2005 Aug;165(1-2):172-8.
 105. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, and Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7
 106. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 1982; 33:167-240
 107. Tan,E.M., Feltkamp,T.E., Smolen,J.S., Butcher,B., Dawkins,R., Fritzler,M.J., Gordon,T., Hardin,J.A., Kalden, J.R., Lahita, R.G., Maini, R.N., McDougal, J.S., Rothfield, N.F., Smeenk, R.J., Takalaki,Y, Wiik, A., Wilson,M.R., Koziol, J.A.:Range of antinuclear antibodies in „healthy“ individuals. *Arthritis Rheum.* 1997,40;1601-1611
 108. Tan-EM, Chan-EKL: Molecular biology of autoantigens and new insights into autoimmunity. *Clin Investig* 71, 1993 :327-330
 109. Terman A, Sandberg S. Proteasome Inhibition Enhances Lipofuscin Formation *Ann N Y Acad Sci* 2002 Nov;973:309-312
 110. Tiao-G; Hobler-S; Wang-JJ; Meyer-TA; Luchette-FA; Fischer-JE; Hasselgren-PO (1997): Sepsis is associated with increased mRNAs of the Ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in human skeletal muscle. *J.clin.Invest.* 99: 163-168
 111. van Noort JM, van Sechel AC, Bajramovic JJ, el Ouagmiri M, Polman CH, Lassmann H et al. The small Heat Shock Protein alpha B- crystallins candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 1998; 101: 1923-31
 112. Viau M, Zouali M. B-lymphocytes, innate immunity, and autoimmunity. *Clin Immunol.* 2005 Jan;114(1):17-26.
 113. Vitali C, Bombardieri S, and Moutsopoulos HM. Preliminary criteria for the classification of Sjögren’s syndrome. Results of an ECC prospective concerted action. *Arthritis Rheum* 1993;36: 340-347
 114. Walsh MJ, Murray JM. Dual Implication of 2’3’-cyclic nucleotide 3’ phosphodiesterase as major autoantigen and C3 complement-binding protein in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J. Clin Invest* 1998; 101: 1923-31
 115. Wigley,C.,Fabunmi,R.P., Lee,M.G., Marino,C.R., Muallem,S., DeMartino,G.N., Thomas,P.J.: Dynamic Association of Proteasomal Machinery with the Centrosome, *J.O.Cell Biology*, V.145. Nr.3, 1999: 481-490
 116. Wilkinson C.R.M., M.Wallace, M.Morphew, P.Perry, R.Allshire,J-P.Javerzat, J.R.McIntosh,C.Gordon, localisation of the 26Sproteasome during mitosis and meiosis in fission yeast, *EMBO*,V.17,pp.6465-6476, 1998
 117. Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, Tugwell P, Campbell SM, Abeles M, Clark P The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum.* 1990 Feb;33:160-72.
 118. Wolfe,J.F., Adelstein,E., Sharp,G.C.: AntinuclearAntibody with distinct specificity for Polymyositis.*J.Clin.Invest.*59,176-178,1977
 119. Wu J On the role of proteasomes in cell biology and proteasome inhibition as a novel frontier in the development of immunosuppressants *Am J Transplant* 2002 Nov;2(10):904-12

Danksagung

Für die Überlassung des Themas sowie die fachliche Beratung bei der Anfertigung der Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Gerd-R. Burmester danken.

Frau Dr. Ulrike Kuckelkorn gilt mein besonderer Dank für Anleitung und Unterstützung, insbesondere im methodischen Teil der Arbeit.

Herrn Dr. med. Karl Egerer danke ich für die ELISA Untersuchungen und seine methodischen Hinweise.

Bei Prof. Dr. Peter-M. Kloetzel bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit mit dem Institut für Biochemie der Charité, für die Bereitstellung von Laborkapazitäten sowie die ausgezeichnete fachliche Beratung.

Herrn Dr. Eugen Feist danke ich für die geleistete Unterstützung.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 23.4.2007

Michael Brychcy